

Unità Operativa Coordinatrice:  
Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana, Sede Centrale Roma, Direzione Operativa  
Diagnostica delle Malattie Virali e delle Leptosirosi  
Relazione Progetto IZS LT 16/11 RC

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  
Tel. 0679099315 Fax 06 79340724  
E-mail: [teresa.scicluna@izslt.it](mailto:teresa.scicluna@izslt.it)

Data di scadenza: 24/12/15

Data di stampa:

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

## **INDICE GENERALE ED ELENCO ALLEGATI**

<b>ELENCO DEI COLLABORATORI</b>	<b>3</b>
<b>SINTESI</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>9</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>12</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>20</b>
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>25</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>32</b>
<b>RACCOMANDAZIONI</b>	<b>37</b>
<b>MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI</b>	<b>38</b>
<b>ALLEGATO 1: TABELLE</b>	<b>39</b>
<b>ALLEGATO 2: GRAFICI</b>	<b>57</b>
<b>ALLEGATO 3: FIGURE</b>	<b>64</b>
<b>ALLEGATO 4: BABESIA CABALLI AND THEILERIA EQUI INFECTIONS IN HORSES IN CENTRAL-SOUTHERN ITALY: SERO-MOLECULAR SURVEY AND ASSOCIATED RISK FACTORS</b>	<b>66</b>
<b>ALLEGATO 5: SCHEDA ANAMNESTICA</b>	<b>74</b>

## **ELENCO DEI COLLABORATORI**

### **Unità Operativa 1**

Responsabile : Maria Teresa Scicluna (Dirigente Veterinario, coordinatore del progetto, analisi dei risultati, stesura relazione)

Collaboratori: Nardini Roberto (Dirigente Veterinario, analisi dei risultati, stesura relazione), Giuseppe Manna (Dirigente Biologo, analisi di laboratorio).

### **Unità Operativa 2**

Responsabile : Francesca Rosone (Dirigente Veterinario, analisi di laboratorio)

Collaboratori: Roberta Giordani, Massimiliano Simula, Maria Rita Viola, Alessia Altigeri, Samanta Sabatini (analisi di laboratorio)

### **Unità Operativa 3**

Responsabile : Gladia Macrì (Dirigente Veterinario)

Collaboratori: Manuela Scarpulla (Dirigente Biologo, analisi di laboratorio); Norma Polinori (Tecnico di laboratorio Biomedico, analisi di laboratorio); Laura Salvato (Tecnico di laboratorio Biomedico, analisi di laboratorio).

### **Unità Operativa 4**

Responsabile: Olga Lai

Collaboratori: Olga Lai (Dirigente Veterinario, analisi di laboratorio), Lavinia Alfieri (Dirigente Biologo, analisi di laboratorio), Emanuela Bucci (Tecnico di laboratorio Biomedico, analisi di laboratorio)

### **Unità Operativa 5**

Responsabile: Antonella Cersini (Dirigente Biologo)

Collaboratori: Valeria Antognetti (Biotecnologo, analisi di laboratorio ), Maurizio Zini (Tecnico di laboratorio Biomedico, analisi di laboratorio).

**SINTESI : Progetto IZS LT 16/11 RC: 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.**

Tra gli agenti eziologici responsabili di sindromi anemico/emolitiche negli equini ci sono *Theileria equi*, *Babesia caballi* e *Anaplasma phagocytophilum*, trasmessi da zecche della famiglia Ixodidae. L'individuazione dei microrganismi negli eritrociti da striscio periferico è possibile solo durante la fase acuta dell'infezione, in alternativa, vengono effettuati test sierologici, Immunofluorescenza Indiretta (IFAT) e Competitive ELISA (cELISA), che comunque non forniscono indicazioni circa la fase dell'infezione. Nelle zone endemiche i test biomolecolari (PCR) possono trovare un utile impiego come test complementari per effettuare un monitoraggio dell'infettività e per definire più chiaramente il ruolo epidemiologico dei soggetti positivi che non presentano sintomatologia. La possibilità di correlare alla positività l'effettivo stato d'infezione con test diretti quantitativi, assume particolare rilevanza ai fini della terapia. Nel Lazio ed in Toscana non sono stati condotti specifici studi di prevalenza e sulle popolazioni autoctone. Gli scopi che il progetto si era prefisso di raggiungere erano:

**WP1- Definire la prevalenza delle infezioni sostenute da *B. caballi*, *T. equi* e *A. phagocytophilum* in popolazioni equine autoctone del Lazio e della Toscana.**

Studio di prevalenza sulla popolazione equina del Centro-Sud Italia. Il numero minimo di campioni da analizzare è risultato 384. Sono stati prelevati campioni di sangue, con e senza EDTA Per identificare i fattori di rischio correlati alle piroplasmosi equine, i dati sulle seguenti variabili sono state registrati: sesso (castrone, maschio femmina); età (giovani  $\leq 6$  anni; adulti tra 7 e 12 anni; anziani  $> 12$  anni); razza (razza straniera; razza italiana: razza mista); accesso al pascolo (sì /no) posizione provincia di residenza (costiera / entroterra); altitudine ( $\leq 150$  metri sul livello del mare (m slm); 151-600 m slm;  $> 600$  m slm); copertura del suolo ( $> 75\%$  di foresta; colture 50-75%; 50-75% foresta; misti, senza dominante della copertura del suolo); zona climatica, tipo di suolo, secondo la classificazione FAO. Due kit ELISA competitive (cELISA) B. equi Antibody test kit and B. caballi Antibody test kit (VMRD ® , Inc, Pullman, WA, USA) sono stati impiegati. I campioni sono stati esaminati con la due Real Time PCR (Kim et al. 2008 per T. equi e Bhoora et al. 2010, per B. caballi). La specificità dei risultati delle rtPCR è stato verificato mediante sequenziamento degli ampliconi di un numero di campioni positivi (44), ottenuti utilizzando un protocollo di nested-PCR (Nagore et al. 2004) per la regione ipervariabile V4 del gene 18s. Le sequenze ottenute sono state analizzate e confrontate con quelle depositate su NCBI GenBank. Sono state calcolate la prevalenza sierologica e la percentuale di PCR-positivi tra i sieropositivi con un IC 95% a livello dell'area di studio, della provincia di residenza e per ogni fattore di rischio indagato. L'associazione tra variabili e positività è stata verificata con un'analisi univariata e multivariata. La situazione epidemiologica è riportata in Figura 1. Questo studio definisce la presenza di una elevata sieroprevalenza e di un elevato numero di malattia asintomatica in cavalli PCR-positivi per entrambi i parassiti, con un cluster nella regione Lazio. Diversi fattori di rischio associati con l'ospite e l'ambiente sono risultati significativamente correlati alla positività per Piroplasmosi Equine. Ulteriori indagini sull'influenza dei fattori ambientali sono necessarie e in particolare sull'ecologia e la distribuzione di zecche in quest'area. Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, programmi di controllo potrebbero essere sviluppati con l'adozione di pratiche idonee, tra cui controllo delle zecche, utilizzo del territorio ed adeguatezza della gestione del cavallo, utili nel limitare gli interventi farmacologici.

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

Dopo una ricerca bibliografica sono stati scelti dei 4 protocolli PCR diversi per ogni protozoo da confrontare su 103 campioni di sangue intero di equidi clinicamente sospetti

I protocolli di PCR analizzati sono i seguenti: *T. equi* (T): End Point PCR (T1) (Battsetseg B. et al.; 2001) ; Nested-PCR (T2), (Nicolaiewsky T.B. et al.; 2001); Real Time PCR (T3) (Kim C. et al.; 2008); Real Time T. Equi Genesig ® (T4). Per B. caballi End Point PCR (B1) (Battsetseg B. et al.;

2001), Nested PCR (B2), (Bhoora et al.;2010); Real Time PCR (B3) (Bhoora et al.; 2010); Real Time B. caballi (Genesig®) (B4). La specificità dei risultati discordanti è stata verificata mediante sequenziamento. La PCR che ha rilevato il maggior numero di positivi è stata utilizzata per il calcolo della sensibilità (RSE) e specificità relativa (RSP). Successivamente un campione di 1300 soggetti pervenuti presso il laboratorio CERME per diagnostica o ricerca sono stati retrospettivamente raccolti e i risultati delle analisi effettuate sono stati confrontati. I metodi diagnostici utilizzati sono i seguenti: esame microscopico di striscio di sangue; Real Time PCR per T. equi e B. caballi (Kim C. et al.; 2008; Bhoora et al.; 2010 e Genesig®); cELISA B. caballi e B. equi Antibody test kit (VMRD®, Inc, Pullman, WA, USA); B. caballi e B. equi IFA IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories®). Per l'analisi filogenetica sono stati selezionati 100 campioni di sangue da equidi del Centro-Sud Italia. L'omologia di sequenza è stata effettuata utilizzando BLAST e NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sono stati costruiti alberi filogenetici utilizzando Geneious 9.1.3. È stato utilizzato il modello di distanza genetica Tamura-Nei e il metodo neighbor-joining senza outgroup. La relazione tra presenza di sintomatologia, discordanza tra test sierologico e PCR variabili e i gruppi filogenetici sono state valutate usando il test esatto di Fisher o la Chi quadro.

### **WP 3 “Studio caso/controllo per l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi”**

Durante le stagioni vettoriali 2013 e 2014 campioni di soggetti sospetti e di soggetti asintomatici sono stati prelevati in tutto il territorio di competenza dell'Istituto Zooprofilattico. I campioni consistevano in sangue con e senza anticoagulante ed ogni prelievo doveva essere accompagnato da una scheda anamnestica. Sui campioni sono state eseguite le seguenti analisi: Anaplasma (IFI e PCR); Babesia (ELISA, IFI e PCR); Theileria (ELISA, IFI e PCR); Leptospira (MAT e PCR); Anemia Infettiva Equina (ELISA); Striscio ematico periferico (esame microscopico); emocromo e protidogramma e diversi parametri biochimici. Sulla base dei risultati ogni sospetto e controllo è stato classificato come confermato o meno e i casi ulteriormente suddivisi in base al parassita riscontrato. È stata effettuata un'analisi descrittiva e associazioni tra fattori di rischio. Inoltre è stata effettuata un'analisi descrittiva e associazioni tra parametri ematobiochimici vs caso/controllo. Per ogni sintomo è stata eseguita un'analisi descrittiva stratificata per tipo di caso confermato per numero di sintomi. Per tutte le analisi statistiche è stato considerato come significativo un  $p < 0,05$ . I risultati sono riportati nel Grafico 1.

Quando impiegato in Italia, il cELISA per B. caballi sembra essere inefficace, come la PCR commerciale per entrambi i parassiti. L'IFAT sia per piroplasmi e cELISA per T. equi sembra essere utile, come la PCR letteratura per entrambi i parassiti, per valutare lo stato sanitario di un soggetto e indirizzare il libero professionista. Alla situazione attuale, l'algoritmo diagnostico proposto in Tabella 1 sembra garantire le migliori prestazioni sensibilità ed efficacia nella diagnosi EP. Per quanto riguarda lo studio filogenetico anche in Italia sembrano essere presenti tre tipologie genetiche di piroplasmi Gruppo 1, 2 e 3. Il gruppo 1 sembra includere ceppi parassitari più patogeni, che causano però una risposta anticorpale assente, ridotta o non rilevata dai test in uso; mentre sono rilevati dalla PCR. Al contrario i ceppi degli altri due gruppi, sembrano essere correlati con uno stato asintomatico, rilevabile sierologicamente ma non con la PCR. Studi più approfonditi sono necessari per chiarire questi risultati.

### **WP 4 “Divulgazione dei risultati della ricerca”.**

Pubblicazione di articoli in riviste con Impact Factor, partecipazione a convegni nazionali e internazionali, giornate di aggiornamento dei liberi professionisti.

#### **Bibliografia essenziale:**

Bhoora, R. et al., Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses from South Africa. 2010. Vet. Parasitol. 168, 201–211.

Kim, C.M., et al., Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of Theileria equi from equine blood samples. Vet. Parasitol. 151, 158–163.

Bartolomé Del Pino L.E., Nardini R., Veneziano V., Iaconi F., Cersini A., Autorino G. L., Buono F., Scicluna M.T. Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Central-Southern Italy: sero-molecular survey and associated risk factors. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.011> Ticks and Tick-borne Diseases 7 (2016) 462–469

Figura 1: Prevalenze sierologiche e in PCR per T. equi (A) e B. caballi (B) per ogni provincia. Il primo numero è la prevalenza sierologica, il secondo numero è la prevalenza in PCR. La posizione delle province in Italia è mostrato in basso a sinistra. La stella in figura rappresenta posizione di Aurunci.

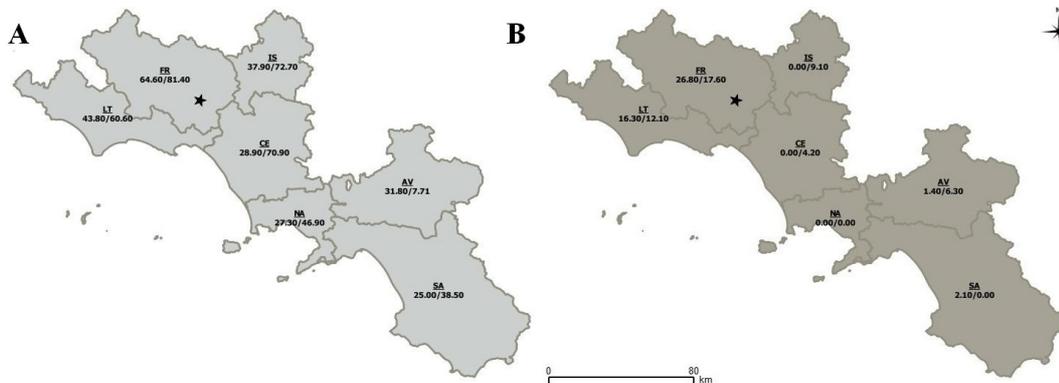


Grafico 1 Contributo nel rilevare la positività per B. caballi (sx) e T. equi (dx), in termini di percentuale cumulativa, di due metodi sierologici (IFAT, ELISA) e di PCR (PCR Genesig® e della letteratura, Kim et al., 2008, Bhoora et al., 2010), su 274 campioni di equidi in quattro algoritmi diagnostici ipotetici in cui solo i negativi al test precedente sono analizzati con il successivo. In ordine di esecuzione A: ELISA, IFAT, PCR Genesig®, PCR Letteratura; B: ELISA, IFAT, Letteratura PCR, PCR Genesig®; C: IFAT, ELISA, PCR Genesig®, PCR Letteratura; D: IFAT, ELISA, PCR Letteratura, PCR Genesig®.

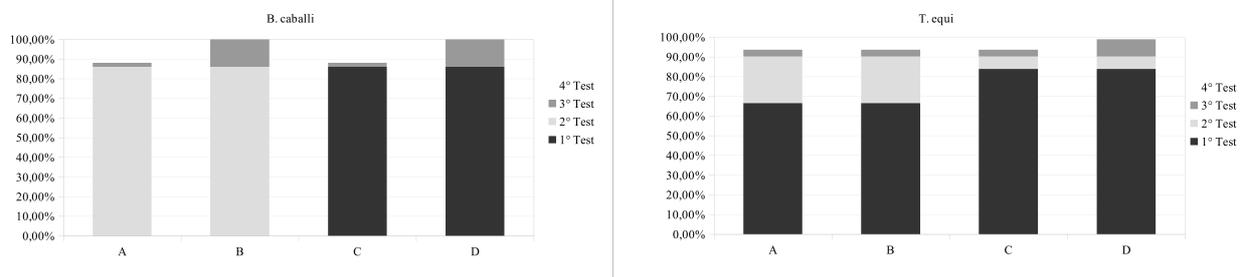


Tabella 1. Algoritmo diagnostico proposto per la valutazione dello stato sanitario per piroplasmosi equina.

		PCR		
		POSITIVO (Ct < 40)	NEGATIVO	INCONCLUSIVO (Ct ≥ 40)
TEST SIEROLOGICI	POSITIVO	<b>INFEZIONE ATTIVA:</b> valutare parametri clinici ed ematologici in funzione di un possibile trattamento. <b>INFEZIONE PASSATA O CRONICA:</b> ripetere PCR con il doppio del template	<b>INFEZIONE PASSATA O CRONICA:</b> ripetere PCR con il doppio del template	<b>INFEZIONE PASSATA O CRONICA:</b> ripetere PCR con il doppio del template
	NEGATIVO	<b>INFEZIONE RECENTE:</b> monitorare per seroconversione; valutare parametri clinici ed ematologici in funzione di un possibile trattamento.	<b>NON INFETTO</b>	<b>SOSPETTO:</b> ripetere PCR con il doppio del template

Autori: Roberto Nardini, Maria Teresa Scicluna, Gian Luca Autorino. Parole chiave: Theileria equi, Babesia caballi, Prevalenza sierologica, PCR, Confronto metodi, Fattori di rischio, Filogenesi.  
 Mail di riferimento: [teresa.scicluna@izsl.it](mailto:teresa.scicluna@izsl.it)

**SUMMARY Project IZSLT 16/11 RC: Estimation of the prevalence of infections with *Theileria equi* and *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in the Lazio and Tuscany regions. Development of quantitative methods and analysis of different diagnostic methods in use in relation to the health status of infected animals.**

*Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum*, transmitted by ticks of the family Ixodidae are among the causative agents responsible for anemic / hemolytic syndromes in equines. The identification of microorganisms in erythrocytes from peripheral smear is only possible during the acute phase of infection, while the serological tests available, indirect immunofluorescence test (IFAT) and Competitive ELISA (cELISA) do not provide information relative to the carrier state. In endemic areas, biomolecular tests (PCR) can be usefully used as a complementary test to monitor infectivity and to more clearly define the epidemiological role of positive asymptomatic subjects. Relating the true carrier status with a direct quantitative test is particularly relevant for the purposes of therapy. The goals that the project aimed to achieve were:

**WP1- Define the prevalence of infections for *B. caballi*, *T. equi* and *A. phagocytophilum* in native horse populations of Latium and Tuscany.** Prevalence study on the equine population in Central and Southern Italy. The minimum number of samples to analyze were 384. Blood samples were taken, with and without EDTA to identify risk factors related to equine piroplasmiasis, data on the following variables were recorded: sex (gelding, male female); age (young  $\leq 6$  years; adults between 7 to 12 years; elderly  $> 12$  years); race (foreign race; Italian race: mixed race); access to pasture (yes / no) province of residence (coastal / inland); altitude ( $\leq 150$  meters above sea level (asl); 151-600 m above sea level  $> 600$  m above sea level); land cover ( $> 75\%$  of the forest; 50-75% crops; 50-75% forest; mixed, with no dominant land cover); climate zone, soil type, according to the FAO classification. Two competitive ELISA kit (cELISA) *B. equi* and Antibody test kit *B. caballi* Antibody test kit (VMRD®, Inc., Pullman, WA, USA) were used. The samples were the two Real Time PCR (Kim et al. 2008 for *T. equi* and Bhoora et al. 2010 for *B. caballi*). The specificity of the results of the rtPCR was verified by amplicon sequencing of positive samples (44), obtained using a protocol of nested-PCR (Nagore et al. 2004) for the hypervariable V4 region of the gene 18S. The sequences obtained were analyzed and compared with those deposited in NCBI GenBank. The serological prevalence of the study area and the percentage of PCR-positive were calculated for each the province of residence with a 95% level. The association between variables and positivity was assessed with univariate and multivariate analysis. The epidemiological situation is shown in Figure 1. This study defines the presence of a high seroprevalence and of a high number of asymptomatic disease in PCR-positive horses for either of these parasites, with a cluster in the Latium region. Several risk factors associated with the host and the environment were significantly related to the equine piroplasmiasis positivity. Further investigation on the influence of environmental factors are necessary and in particular on the ecology and distribution of mites in this area. Based on the results obtained in this study, the control programs could be developed with the adoption of appropriate practices, including tick control, land use and adequacy of the management of the horse, useful in limiting pharmacological interventions. WP.2. Realisation of a diagnostic protocol employed for the improvement of the diagnostic sensitivity and specificity for the anemic syndromes / haemolytic equine. After a literature search of the 4 we were chosen different PCR protocols for each protozoan to be compared to 103 whole blood samples of clinically suspect equines. The PCR protocols analyzed are the following: *T. equi* (T): End Point PCR (T1) (Battsetseg B. et al. ; 2001); Nested-PCR (T2), (Nicolaiewsky T.B. et al. ; 2001); Real Time PCR (T3) (Kim C. et al. ; 2008); Real Time *T. Equi* Genesig® (T4). For *B. caballi* End Point PCR (B1) (Battsetseg B. et al. ; 2001), Nested PCR (B2), (Bhoora et al., 2010); Real Time PCR (B3) (Bhoora et al. ; 2010); Real Time *B. caballi* (Genesig®) (B4). The specificity of discordant results was verified by sequencing. The PCR that detected the greater number of positive was used for the calculation of the relative sensitivity and specificity. Sample from a total of 1,300 subjects were received at the CERME laboratory diagnostic and retrospectively collected and the results were analyzed and compared. The diagnostic methods used are the following: microscopic examination of blood smears; Real Time PCR for *T. equi* and *B. caballi* (Kim C. et al. ; 2008; Bhoora et al. ; 2010

and Genesig ®); cELISA caballi B. equi and B. Antibody test kit (VMRD®, Inc., Pullman, WA, USA); B. caballi and B. equi IFA IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories ®). For phylogenetic analysis we were selected 100 samples of blood from equidae Central and Southern Italy. The sequence homology was performed using BLAST and NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Phylogenetic trees were constructed using Geneious 9.1.3 It was used the genetic distance model Tamura-Nei and the neighbor-joining method without outgrouping. The relationship between the presence of symptoms, discordant results between serological tests and PCR variables and the phylogenetic groups were evaluated using the Fisher exact test or the Chi square.

**WP 3 "Study case / control for the identification of diagnostic parameters for the definition of the clinical status of the patient with piroplasmosis".** During the 2013 and 2014 seasons, vector samples of suspect cases and asymptomatic subjects were collected in all of the territory of the Institute competence Zooprofilatico. The samples consisted of blood with and without anticoagulant and was accompanied by a medical history sheet . The samples were analyzed using the following tests: Anaplasma (IFI and PCR); Babesia (ELISA, IFI and PCR); Theileria (ELISA, IFI and PCR); Leptospira (MAT and PCR); Equine Infectious Anaemia (ELISA); Peripheral blood smear (microscopy); blood count, serum protein electrophoresis and different biochemical parameters. Based on the results, suspect and control were classified as confirmed or not and cases further subdivided based on the detected parasite. A descriptive analysis was carried out and associations between risk factors evaluated, as well as associations between haemato parameters vs case / control. Each symptom was stratified by type of case for a descriptive analysis . For the statistical analysis  $p < 0.05$  was considered as significant. The results are shown in Chart 1. When employed in Italy, the cELISA for B. caballi appears to be ineffective, as also the commercial PCR for both parasites. L'IFAT for both Piroplasms and cELISA for T. equi appears to be useful, as also the PCR literature for both the parasites, to assess the health of a subject . The current situation, the diagnostic algorithm proposed in Table 1 seems to provide the best performance of sensitivity and effectiveness in EP diagnosis. Relative to the phylogenetic study in Italy there seem to be three types of genetic Piroplasms Groups, 1, 2 and 3. The group 1 appears to include more pathogenic parasitic strains, which, however, cause an antibody response that is absent, reduced or not detected by the tests in use; while detected by PCR. On the contrary the presence of the other two groups, seems to be correlated with an asymptomatic state , but not serologically detectable by PCR. more detailed studies are needed to clarify these findings. WP 4 "Dissemination of research results". Publication of articles in journals with impact factor, participation in national and international conferences, training days of the practitioners.

## INTRODUZIONE

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, mentre il terzo dell'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 causa forme febbrili, alterazioni ematologiche e 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 dell'infezione e necessita di operatori esperti. In alternativa, vengono effettuati test sierologici, Immunofluorescenza Indiretta (IFAT) e Competitive Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (cELISA), che comunque 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, all'elevato costo dei reagenti (Bakheit *et al.*, 2007), ed infine al fatto che, in particolare, per le piroplasmosi esistono animali con infezione cronica che presentano reazioni positivi al limite della rilevabilità quando esaminati con i metodi tradizionali. Nelle zone endemiche, in presenza di anticorpi nella popolazione, i test biomolecolari (PCR), 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.

Inoltre, le piroplasmosi ed l'anaplasmosi prevedono terapie come molecole farmacologiche diverse. 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. 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.

Per quanto riguarda la situazione epidemiologica italiana, sebbene siano state stimate le prevalenze in alcune regioni, 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.

Di conseguenza gli scopi che il progetto si è prefisso di raggiungere sono stati:

- 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.

Per quanto riguarda il Work Package 1 “Definire i dati di prevalenza rispettivamente per *B. caballi* e *T. equi* ed *A. phagocytophilum* in popolazioni autoctone del Lazio e della Toscana” il lavoro è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. 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);
2. Definizione della base campionaria in funzione della prevalenza attesa e delle modalità di raccolta dei campioni di sangue (2 mesi);
3. 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);
4. Raccolta campioni (3-19 mesi);
5. Svolgimento dell'attività analitica. (4-20 mesi);
6. Analisi statistica dei risultati ottenuti dall'indagine (22-24 mesi).

Per quanto riguarda il Work Package 2 “Realizzazione di un protocollo diagnostico impiegato per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica per le sindromi anemico/emolitiche dell'equino” il lavoro è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. Valutazione dei differenti metodi immunologici e molecolari disponibili per la diagnosi di laboratorio delle piroplasmosi/anaplasmosi (2-3 mesi);
2. Messa a punto e/o standardizzazione di metodi diagnostici molecolari quali-quantitativi (3-6 mesi);
3. Definizione di un protocollo diagnostico pilota sulla base dei metodi analitici scelti. (7 mesi);
4. 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);
5. Studio delle sequenze di stiptipi parassitari in funzione dell'origine geografica di provenienza (8-33 mesi);
6. Raccolta ed archiviazione informatica dei risultati (8-33 mesi);
7. Valutazione dei risultati ottenuti (34-35 mesi).

Per quanto riguarda il Work Package 3 “Studio caso/controllo per l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi” il lavoro è stato articolato nelle seguenti fasi:

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

Per quanto riguarda il Work Package 4 “Divulgazione dei risultati della ricerca” il lavoro è stato articolato nelle seguenti fasi:

1. Predisposizione relazioni intermedia e finale. (18-35 mesi);
2. 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).

Con lo scopo di reclutare un numero maggiore di campioni e soprattutto di reclutare i controlli negativi per lo studio caso controllo, è stata richiesta ed ottenuta una proroga di scadenza del progetto. Inoltre, con lo scopo di approfondire la correlazione tra sintomi, risultati di laboratorio e genetica del parassita, è stata anche condotta un’analisi filogenetica sui campioni positivi.

## MATERIALI E METODI

### **WP1- Definire la prevalenza delle infezioni sostenute da *B. caballi*, *T. equi* e *A. phagocytophilum* in popolazioni equine autoctone del Lazio e della Toscana.**

#### *Definizione del campione e dei parametri da valutare*

Questo WP ha coinvolto la popolazione equina del Centro-Sud Italia. La dimensione campionaria è stata definita per una prevalenza attesa del 50% in una popolazione infinita, con un intervallo di confidenza del 95 (95% CI) e una precisione assoluta del 5%. Il numero minimo di campioni è risultato 384. Anche se altri studi riportano valori di prevalenza maggiori (Moretti et al., 2010), i criteri di definizione della numerosità campionaria sono stati selezionati per massimizzare l'accuratezza della stima della prevalenza. Campioni di sangue, con e senza EDTA, sono stati raccolti da veterinari qualificati in modo casuale durante la primavera-estate 2013 tra la popolazione equina residente stabilmente nell'area di studio. Il siero è stato ottenuto mediante centrifugazione per 10 minuti a 358 g e conservato a -20 ° C mentre il sangue con EDTA è stato conservato a -80 ° C. Tutte le manipolazioni sui cavalli sono state effettuate con il consenso dei proprietari e secondo la Direttiva CEE, del 24 novembre 77 1986 (86/609/CEE). Per identificare i fattori di rischio correlati alle piroplassmosi equine, i dati sulle seguenti variabili sono stati registrati al momento della raccolta dei campioni: sesso (castrone, maschio femmina); età (giovani  $\leq$  6 anni; adulti tra 7 e 12 anni; anziani  $>$  12 anni); razza (razza straniera; razza italiana: razza mista); accesso al pascolo (sì /no) posizione provincia di residenza (costiera / entroterra). Inoltre, utilizzando il Global Positioning System, la posizione geografica degli animali inclusi nello studio è stata determinata permettendo di valutare altre variabili come altitudine ( $\leq$  150 metri sul livello del mare (m slm); 151-600 m slm;  $>$  600 m slm); copertura del suolo ( $>$  75% di foresta; colture 50-75%; 50-75% foresta; misti, senza dominante della copertura del suolo); zona climatica, in base alla durata del periodo di crescita (LGP), che è il numero di giorni nel corso di un anno, in cui le precipitazioni superano la metà del potenziale di evapotraspirazione (umido LGP 270-365 giorni; sub-umido LGP 180-269 giorni; umido-semiarido LGP 120-179 giorni); tipo di suolo, per cui, riferendosi alla classificazione FAO, i tipi identificati nell'area di studio erano Eutric Cambisol, Dystric Cambisol, Andosol e Chromic Luvisol. Gli Eutric Cambisols sono tra i terreni più produttivi mentre i Dystric Cambisols, anche se meno fertili, sono utilizzati come terreni agricoli, da pascolo e seminativi misti. Gli Andosols sono intensamente coltivati e sono piantati con una varietà di colture, anche se la loro limitazione importante è rendere il fosforo non disponibile per le piante. I Chromic Luvisols sono terreni ricchi di idrossidi di ferro con un alto contenuto di nutrienti e un buon drenaggio, di solito formano paesaggi piatti o leggermente in pendenza, sotto i regimi climatici che vanno dal temperato freddo al Mediterraneo. Le loro caratteristiche li rendono adatti per un'ampia gamma di colture, da cereali a frutteti a vigneti. Il sito FAO è stato utilizzato per ottenere informazioni sulla copertura del suolo, zona climatica e tipo di terreno. Dettagli sulla classificazione delle zone climatiche possono essere ottenuti dal sito web della FAO mentre quelli per i tipi di terreno dal International Soil Reference and Information Centre (ISRIC) e dal sito web della FAO.

#### *Test sierologici*

Due kit ELISA competitiva (cELISA) B. equi Antibody test kit and B. caballi Antibody test kit (VMRD ®, Inc, Pullman, WA, USA) sono stati impiegati in base alle istruzioni del produttore.

#### *Test molecolari*

Il sangue con EDTA dei 273 animali seropositivi è stata esaminata con la PCR per identificare quelli con un doppio reattività (sierologica e molecolare) che potrebbero meglio correlare con uno stato di infezione recente/attiva e di identificare i fattori di rischio associati a questo stato.

I protocolli di Real Time PCR (rtPCR) utilizzati sono quelli descritti da Kim et al. (2008) per *T. equi* e Bhoora et al. (2010), per *B. caballi*. Questi metodi sono stati scelti in seguito ad uno studio effettuato per la valutazione della sensibilità e la specificità di alcuni dei metodi PCR riportati in letteratura o disponibile in commercio descritto in seguito (WP2). L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando il QIAcube HT (Qiagen, GmbH, Hilden, Germania) e il kit QIAamp Cador

Pathogen Mini (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. LE caratteristiche delle PCR sono descritte nel WP2. Per entrambe le rtPCR, è stata utilizzata la TaqMan® Universal PCR Master Mix Kit (A. Biosystems, Foster City, CA, USA). I controlli interni positivi sono prodotti di PCR per *B. caballi* e *T. equi*, ottenuti da campioni di sangue EDTA di soggetti sintomatici sieropositivi, certificati dal Laboratorio di Riferimento OIE per le Babesiosi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, e clonati nel plasmide pCRII® -TOPO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Il controllo negativo usato nelle reazioni stato acqua RNAase free. Le rtPCR sono state effettuate utilizzando l' ABIPRISM 7900 HT Sequence Detection System (A.Biosystems).

#### *Sequenziamento*

La specificità dei risultati delle rtPCR è stata verificata mediante sequenziamento degli ampliconi di un numero di campioni positivi (44), ottenuti utilizzando un protocollo di nested-PCR come descritto da Nagore et al. (2004), amplificando la regione ipervariabile V4 del gene 18s di entrambi i protozoi, gli ampliconi sono stati sequenziati utilizzando un sequenziatore automatico (3500 Genetic Analyzer, A. Biosystems, Foster City, CA, USA) e le sequenze nucleotidiche ottenute sono state analizzate utilizzando l'analizzatore genetico Sequencing v5.4 (A. Biosystems, Foster City, CA, USA). l'identità di sequenza è stata verificata utilizzando BLAST e le sequenze risultanti con un'identità e un query coverage  $\geq 98\%$  rispetto alle sequenze depositate su NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sono state considerate omologhe.

#### *Analisi statistica*

La prevalenza sierologica e la percentuale di PCR-positivi tra i sieropositivi con un IC 95% sono stati calcolati come descritto da Thrusfield (2007), sia a livello dell'area di studio, della provincia di residenza e per ogni fattore di rischio indagato. L'associazione tra variabili e positività per ogni piroplasma è stata verificata in due fasi. In una prima fase, le associazioni prevalenze per *T. equi* e *B. caballi* e per ogni fattore di rischio considerato sono stati valutati utilizzando il test del Chi quadrato o il test esatto di Fisher. I fattori con  $p \leq 0.05$  sono stati poi inclusi in una regressione logistica. Il Software v.12.0 STATA SE per Windows (StataCorp LP, Texas, USA) è stato utilizzato per tutte le analisi statistiche.

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

Dopo una ricerca bibliografica sono stati scelti dei protocolli da confrontare.

103 campioni di sangue intero di equidi clinicamente sospetti, raccolti all'interno di un progetto di ricerca del Cerme, sono stati analizzati utilizzando 4 PCR diverse per ogni protozoo. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il Cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit (Qiagen®).

I protocolli di PCR analizzati sono i seguenti:

#### *T. equi* (T):

- a) End Point PCR (T1) (Battsetseg B. et al.; 2001) che ha come target il complesso EMA e amplifica una regione di 268 bp;
- b) Nested-PCR (T2), (Nicolaiewsky T.B. et al.; 2001) che ha come target il complesso EMA e amplifica una regione di 102bp;
- c) Real Time PCR (T3) con target il gene 18S (81bp) (Kim C. et al.; 2008);
- d) Real Time *T. Equi* Genesig® (T4) con target EMA 1 (circa 120 pb).

#### *B. caballi* (B):

- a) End Point PCR (B1) (Battsetseg B. et al.; 2001) che ha come target il gene RAP (825bp);
- b) Nested PCR (B2), che ha come target il gene RAP (430bp) (Bhoora et al.;2010);
- c) Real Time PCR (B3) con target il gene 18S (95bp) (Bhoora et al.; 2010);
- d) Real Time *B. caballi* (Genesig®) (B4) con target il gene 18s (circa 100bp).

La specificità dei risultati discordanti è stata verificata mediante sequenziamento (vedi paragrafo Analisi filogenetica). La PCR che ha rilevato il maggior numero di positivi è stata presa come riferimento per il calcolo della sensibilità relativa (RSE) e specificità relativa (RSP). La concordanza tra le PCR per ciascun parassita è stata valutata.

Successivamente un campione di 1300 soggetti pervenuti presso il laboratorio CERME per diagnostica o ricerca sono stati retrospettivamente raccolti e i risultati delle analisi effettuate sono stati confrontati.

I metodi diagnostici utilizzati sono i seguenti:

1. Diagnosi diretta
  - a) Esame microscopico di striscio di sangue;
  - b) Real Time PCR per T. equi (Kim C. et al.; 2008);
  - c) Real Time T. Equi Genesig<sup>®</sup> ;
  - d) Real Time PCR per B. cavalli (Bhoora et al.; 2010);
  - e) Real Time B. cavalli (Genesig<sup>®</sup>).
2. Diagnosi indiretta
  - a) cELISA B. cavalli Antibody test kit (VMRD<sup>®</sup>, Inc, Pullman, WA, USA);
  - b) cELISA B. equi Antibody test kit (VMRD<sup>®</sup>, Inc, Pullman, WA, USA);
  - c) B. cavalli IFA IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories<sup>®</sup>);
  - d) B. equi IFA IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories<sup>®</sup>)

### *Analisi filogenetica*

Per le analisi filogenetiche e la selezione dei campioni per le prove di clonaggio è stato scelto un protocollo di Nested PCR che ha permesso l'amplificazione delle regioni ipervariabili V4 interne al 18S gene disponibile in bibliografia (Nagore D., Garcia-SanMartin J., Garcia Perez, AL., Juste RA., Hurtado A. Detection and identification of equine Theileria and Babesia species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis (2004) Veterinary Parasitology Vol. 123: 41-54).

Per *Babesia cavalli* sono stati effettuati due tipi di clonaggio:

1. Sono stati selezionati diversi campioni di equidi (sangue con EDTA), si è proceduto con l'estrazione del DNA mediante Kit commerciale DNA Blood, QIAGEN<sup>®</sup> e i DNA estratti sono stati utilizzati come stampo per la real time il cui target è il 18S secondo il protocollo descritto nelle Tabelle 1 e 2. I campioni positivi in Real Time sono stati sequenziati. I campioni che hanno presentato omologie di sequenza per i ceppi di *Babesia cavalli* sono stati scelti per effettuare il clonaggio della regione 18S secondo il seguente protocollo :
  - a) Estrazione da gel mediante il kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen).
  - b) Quantificazione mediante corsa elettroforetica e paragonane con un apposito ladder di quantificazione. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).
  - c) Preparazione delle miscele di ligasi. Sono state effettuate 3 miscele di ligasi, riepilogate in Tabella 3.
  - d) Incubazione di tutte e 3 le miscele overnight a temperatura ambiente
  - e) Trasformazione delle cellule competenti: le cellule di *Escherichia coli* competenti sono fornite dal kit (One Shot TOP 10, Invitrogen) e sono state preparate in modo tale da effettuare la trasformazione chimica. E' stato eseguito il seguente protocollo Transforming One Shot (Invitrogen): 2µl di ligasi sono stati messi a contatto con 40 µl di cellule competenti (One shot TOP 10), la reazione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti e successivamente è stato effettuato lo shock termico ponendo nel Thermomix le cellule competenti con la miscela di ligasi a 42°C per un minuto senza agitazione.Immediatamente dopo le cellule competenti trasformate sono state poste in ghiaccio per 5 minuti. Terminato il periodo di incubazione si sono aggiunti 200 µl di S.O.C a temperatura ambiente e si incubano per un'ora e mezza a 37°C in agitazione. Terminato il periodo di incubazione, 20 µl di brodocoltura vengono utilizzati per effettuare un arricchimento in brodo con ampicillina ed i restanti 180 µl sono stati spatolati su piastre di terreno LB con ampicillina. L'ampicillina è lo specifico antibiotico di selezione, addizionato con X-gal, che permette di

- discriminare all'interno della regione polilinker, ossia la regione del plasmide pCR2.1-TOPO in cui viene integrato il DNA clonato.
- f) Screening dei plasmidi ricombinanti. Tutte le colonie batteriche con colorazione blu vengono scartate, mentre le colonie bianche vengono purificate su terreno solido LB agar adizionato con ampicillina e X-gal, in modo tale da verificare sia l'incapacità di metabolizzare l'X-gal che la resistenza all'ampicillina.
  - g) Analisi in PCR dei veri plasmidi ricombinanti. Le colonie ricombinanti X-gal negative ed ampicillina resistenti sono state messe a crescere overnight in brodo LB addizionato con ampicillina in modo tale da estrarre i plasmidi ricombinanti con il kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel). Contemporaneamente gli stampi plasmidici sono stati ottenuti anche dalle colonie sottoposte a rottura meccanica mediante trattamento a 99°C per 15 minuti. I plasmidi estratti sono stati sottoposti a 2 tipi di PCR. Un primo tipo di PCR in cui vengono utilizzati i primer M13 che fiancheggiano la zona polilinker del plasmide ed un secondo tipo di PCR in cui vengono utilizzate i primer della Real Time 18 S *B.caballi*.
  - h) Sequenziamento dei prodotti di PCR. Soltanto i prodotti di PCR delle adeguate dimensioni sono stati considerati. Questi prodotti di PCR sono stati purificati mediante il kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) e quantizzati mediante corsa elettroforetica, paragonandoli con un apposito ladder di quantificazione. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Successivamente sono stati sottoposti a sequenziamento.
  - i) Verifica del plasmide selezionato. Il plasmide selezionato è stato utilizzato come stampo per effettuare la Real Time *Babesia caballi*, contemporaneamente un'aliquota è stata sottoposta a digestione enzimatica con EcoRV. La digestione enzimatica è stata precipitata overnight in modo tale da recuperare il plasmide linearizzato ed eliminare l'enzima. Il plasmide linearizzato è stato anche utilizzato per effettuare la Real Time *B.caballi*. Per verificare il corretto funzionamento del plasmide selezionato è stata anche effettuata la Real Time *Theileria equi* utilizzando come stampi il plasmide selezionato linearizzato e non linearizzato.
2. I campioni di campo venuti positivi in Real Time *B. caballi* ed ulteriormente confermati sia mediante diversi protocolli di PCR specifici per *B.caballi* che mediante sequenziamento degli stessi amplificati sono stati poi impiegati come stampo per la PCR relativa alla regione ipervariabile V4 di *B. caballi*. Per la PCR effettuata coi primer RLB1 della regione ipervariabile V4 18s il kit impiegato è il TaqPolymerasi Kit<sup>™</sup> (Invitrogen); la soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 4 e 5 rispettivamente. Il prodotto di PCR consta di un segmento di 430 bp. Per la PCR effettuata coi primer RLB2 della regione ipervariabile V4 18s. (dal nucleotide 437 al nucleotide 939) il kit impiegato è il TaqPolymerasi Kit<sup>™</sup> (Invitrogen), la soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 6 e 7 rispettivamente. Il prodotto di PCR consta di un segmento di 460-520 bp.
- Il protocollo seguito è il seguente:
- a) Estrazione da gel mediante il kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen)
  - b) Quantificazione mediante corsa elettroforetica e paragonane con un apposito ladder di quantificazione. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).
  - c) Preparazione delle miscele di ligasi. Sono state effettuate 2 miscele di ligasi, riepilogate in Tabella 8.
  - d) Incubazione di tutte e 2 le miscele overnight a temperatura ambiente.
  - e) Trasformazione delle cellule competenti: le cellule di *Escherichia coli* competenti sono fornite dal kit (One Shot TOP 10, Invitrogen) e sono state preparate in modo tale da effettuare la trasformazione chimica. E' stato eseguito il seguente protocollo Transforming One Shot (Invitrogen): 2µl di ligasi sono

stati messi a contatto con 40 µl di cellule competenti (One shot TOP 10), la reazione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti e successivamente è stato effettuato lo shock termico ponendo nel Thermomix le cellule competenti con la miscela di ligasi a 42°C per un minuto senza agitazione. Immediatamente dopo le cellule competenti trasformate sono state poste in ghiaccio per 5 minuti. Terminato il periodo di incubazione si sono aggiunti 200 µl di S.O.C a temperatura ambiente e si incubano per un'ora e mezza a 37°C in agitazione. Terminato il periodo di incubazione, 20 µl di brodocoltura vengono utilizzati per effettuare un arricchimento in brodo con ampicillina ed i restanti 180 µl sono stati spatolati su piastre di terreno LB con ampicillina. L'ampicillina è lo specifico antibiotico di selezione, addizionato con X-gal, che permette di discriminare all'interno della regione polilinker, ossia la regione del plasmide pCR2.1-TOPO in cui viene integrato il DNA clonato.

- f) Screening dei plasmidi ricombinanti. Tutte le colonie batteriche con colorazione blu vengono scartate, mentre le colonie bianche vengono purificate su terreno solido LB agar adizionato con ampicillina e X-gal, in modo tale da verificare sia l'incapacità di metabolizzare l'X-gal che la resistenza all'ampicillina.
- g) Analisi in PCR dei veri plasmidi ricombinanti. Le colonie ricombinanti X-gal negative ed ampicillina resistenti sono state messe a crescere overnight in brodo LB addizionato con ampicillina in modo tale da estrarre i plasmidi ricombinanti con il kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel). Contemporaneamente gli stampi plasmidici sono stati ottenuti anche dalle colonie sottoposte a rottura meccanica mediante trattamento termico a 99°C per 15 minuti. I plasmidi estratti sono stati sottoposti a 3 tipi di PCR. Un primo tipo di PCR in cui vengono utilizzati i primer M13 che fiancheggiano la zona polilinker del plasmide, un secondo tipo di PCR in cui vengono utilizzate i primer della PCR RLB1 ed un terzo tipo di PCR in cui vengono utilizzati i primer RLB2.
- h) Sequenziamento dei prodotti di PCR. Soltanto i prodotti di PCR delle adeguate dimensioni sono stati considerati. Questi prodotti di PCR sono stati purificati mediante il kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen) e quantizzati mediante corsa elettroforetica, paragonandoli con un apposito ladder di quantificazione. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Successivamente sono stati sottoposti a sequenziamento.
- i) Verifica del plasmide selezionato. Il plasmide selezionato è stato utilizzato come stampo per effettuare la Real Time *Babesia caballi*, contemporaneamente un'aliquota è stata sottoposta a digestione enzimatica con EcoRV. La digestione enzimatica è stata precipitata overnight in modo tale da recuperare il plasmide linearizzato ed eliminare l'enzima. Il plasmide linearizzato è stato anche utilizzato per effettuare la Real Time *B.caballi*. Per verificare il corretto funzionamento del plasmide selezionato è stata anche effettuata la Real Time *Theileria equi* utilizzando come stampi il plasmide selezionato linearizzato e non linearizzato.

E' stato inoltre selezionato il coagulo 26220 certificato dal Centro di Referenza perché è risultato positivo in Real Time *B.caballi* e negativo in Real Time *Theileria equi*. Questo stesso coagulo è stato sottoposto alla nested PCR con la prima coppia di primer RLB1F/RLB1R e con la seconda coppia di primer RLB2F/RLB2R. Le sequenze ottenute sono state esaminate per verificare la presenza della sequenza target per la Real Time *B.caballi*. Attualmente è in corso la costruzione della curva standard.

Per *Theileria equi* sono stati effettuate due prove di clonaggio:

1. Sono stati selezionati diversi campioni di equidi (sangue con EDTA), e si è proceduto con l'estrazione del DNA mediante Kit commerciale DNA Blood,

QIAGEN ® e i DNA estratti sono stati utilizzati come stampo per la real time il cui target è il 18S secondo il seguente protocollo:

- a) Per la PCR kit impiegato è il TaqMan<sup>™</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems); la soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 9 e 10 rispettivamente. Il prodotto di PCR consta di un segmento di 81 bp.
- b) I campioni positivi in Real Time sono stati sequenziati per accertare la loro appartenenza a *T.equi*. I campioni che hanno presentato omologie di sequenza per i ceppi di *Theileria equi* sono stati scelti per effettuare il clonaggio della regione V4.
- c) Amplificazione della regione ipervariabile V4 di *T.equi*. Si utilizza una Nested PCR, la soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 11, 5 e 7 rispettivamente per la prima e la seconda reazione.
- d) I prodotti della nested PCR sono stati sequenziati. Per il loro sequenziamento sono stati prima estratti da gel mediante il kit QIAquick PCR purification Kit (Qiagen). E quantificati mediante corsa elettroforetica e paragonandoli con un apposito ladder di quantificazione. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).
- e) Preparazione delle miscele di ligasi. Sono state effettuate 2 miscele di ligasi, riepilogate in Tabella 8.
- f) Incubate tutte e 2 le miscele overnight a temperatura ambiente.
- g) Trasformazione delle cellule competenti: le cellule di *Escherichia coli* competenti sono fornite dal kit (One Shot TOP 10, Invitrogen) e sono state preparate in modo tale da effettuare la trasformazione chimica. E' stato seguito il seguente protocollo Transforming One Shot (Invitrogen): 2µl di ligasi sono stati messi a contatto con 40 µl di cellule competenti (One shot TOP 10). La reazione è stata incubata in ghiaccio per 30 minuti. E' stato effettuato lo shock termico ponendo nel Thermomix le cellule competenti con la miscela di ligasi a 42°C per un minuto senza agitazione. Immediatamente dopo le cellule competenti trasformate sono state poste in ghiaccio per 5 minuti. Terminato il periodo di incubazione si aggiungono 200µl di S.O.C a temperatura ambiente e si incubano per un'ora e mezza a 37°C in agitazione. Terminato il periodo di incubazione, 20 µl di brodocoltura vengono utilizzati per effettuare un arricchimento in brodo con ampicillina. I restanti 180 µl sono stati spatolati su piastre di terreno LB con ampicillina, lo specifico antibiotico di selezione, addizionato con X-gal che permette di discriminare all'interno della regione polilinker, ossia la regione del plasmide pCR2.1-TOPO in cui viene integrato il DNA clonato.
- h) Screening dei plasmidi ricombinanti. Tutte le colonie batteriche con colorazione blu vengono scartate, mentre le colonie bianche vengono purificate su terreno solido LB agar adizionato con ampicillina e X-gal, in modo tale da verificare sia l'incapacità di metabolizzare l'X-gal che la resistenza all'ampicillina.
- i) Analisi in PCR dei veri plasmidi ricombinanti. Le colonie ricombinanti X-gal negative ed ampicillina resistenti sono state messe a crescere overnight in brodo LB addizionato con ampicillina in modo tale da estrarre i plasmidi ricombinanti con il kit NucleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel). Contemporaneamente gli stampi plasmidici sono stati ottenuti anche dalle colonie sottoposte a rottura meccanica mediante trattamento termico a 99°C per 15 minuti.
- j) I plasmidi estratti sono stati sottoposti a 3 tipi di PCR. Un primo tipo di PCR in cui vengono utilizzati i primer M13 che fiancheggiano la zona polilinker del plasmide, un secondo tipo di PCR in cui si utilizzano i primer RLB1F/RLB1R ed un terzo tipo di PCR in cui vengono utilizzate i primer RLB2F/RLB2R.
- k) Soltanto i prodotti di PCR delle adeguate dimensioni sono stati considerati. Questi prodotti di PCR sono stati purificati mediante il kit QIAquick PCR

purification Kit (Qiagen) e quantizzati mediante corsa elettroforetica, paragonandoli con un apposito ladder di quantificazione. Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Successivamente sono stati sottoposti a sequenziamento.

- 1) Verifica dei plasmidi selezionati e relativi al clonaggio della regione ipervariabile V4 per *Theileria equi*. I plasmidi B e C sono stati utilizzati come stampo per effettuare la Real Time *Theileria equi*, contemporaneamente un' aliquota sia del plasmide B che C sono state sottoposte a digestione enzimatica con EcoRV. Le digestioni enzimatiche sono state precipitate overnight in modo tale da recuperare i plasmidi linearizzati ed eliminare l'enzima. I plasmidi linearizzati sono stati anche utilizzati per effettuare la Real Time *T.equi*. Per verificare il corretto funzionamento dei plasmidi è stata anche effettuata la Real Time *Babesia caballi* utilizzando come stampi i plasmidi B e C linearizzati e non linearizzati.
2. Il secondo tipo di clonaggio è totalmente identico al primo tranne per l'aggiunta della 3'A-Overhangs Post-Amplification come consigliato dal kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) tra i punti d) ed e).

E' stato inoltre selezionato il coagulo 13628/3 certificato dal Centro di Referenza perché è risultato positivo in Real Time *Theileria equi* e negativo in Real Time *B.caballi*. Questo stesso coagulo è stato sottoposto alla nested PCR con la prima coppia di primer RLB1F/RLB1R e con la seconda coppia di primer RLB2F/RLB2R. Le sequenze ottenute sono state esaminate per verificare la presenza della sequenza target per la Real Time *Theileria equi*. Attualmente è in corso la costruzione della curva standard.

Gli ampliconi sono stati sequenziati utilizzando un sequenziatore automatico (3500 Genetic Analyzer, A. Biosystems, Foster City, CA, USA) e le sequenze nucleotidiche ottenuti sono stati analizzate utilizzando l'analizzatore genetico Sequencing v5.4 (A. Biosystems, Foster City, CA, USA). identità di sequenza è stata verificata utilizzando BLAST e le sequenze risultanti con un'identità e un query coverage  $\geq 98\%$  rispetto alle sequenze depositata su NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) sono state considerate omologhe.

I dati derivanti dai sequenziamenti sono stati utilizzati in uno studio filogenetico per verificare la presenza di una correlazione tra risultati di laboratorio e sequenza.

Per l'analisi filogenetica sono stati selezionati 100 campioni di sangue da equidi del Centro-Sud Italia raccolte tra 2013 e 2014, 77 cavalli (35 sintomatici e 42 asintomatici) e 23 asini (2 sintomatici e 21 asintomatici); sono stati scelti per la loro forte positività in PCR Real Time (Ct <24) gene 18S o per mostrare discordanza tra il test sierologico ELISA e PCR.

Le sequenze sono state assemblate ed allineate con Geneious 9.1.3. L'omologia di sequenza è stata effettuata utilizzando BLAST e confrontandole con sequenze di piroplasma equine presenti su NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le sequenze hanno mostrato più del 98% di omologia di sequenza e 98% di query coverage con quelle depositate in GenBank.

L'analisi filogenetica è stata effettuata utilizzando la distanza e omologia per determinare la presenza di diversi gruppi.

Sono state scelte per costruire alberi filogenetici utilizzando Geneious 9.1.3 un numero di sequenze ottenute dai prodotti della nested PCR per la tipizzazione; 49 di *Theileria equi*, 6 di *Babesia caballi* e alcuni sequenze registrate in GenBank (per *T.equi* Z15105, AY534882, AB515315 e Z15104 e per *B.caballi*, AY534883, EU642514). È stato utilizzato il modello di distanza genetica Tamura-Nei e il metodo neighbor-joining senza outgroup.

La relazione tra le variabili esplicative e i gruppi filogenetici sono state valutate usando il test esatto di Fisher o la Chi quadro. Sono stati selezionate le variabili: presenza di sintomatologia, discordanza tra test sierologico e PCR, coinfezione (positivi ad entrambe le PCR real time) e la mancanza o debole positività alla PCR EMA (per le sequenze di *Theileria*). Un valore di  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Il software SAS 9.4 per Windows è stato utilizzato per tutte le analisi statistiche.

### **WP 3 “Studio caso/controllo per l’identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi”**

Durante le stagioni vettoriali 2013 e 2014 campioni di soggetti sospetti e di soggetti asintomatici sono stati prelevati in tutto il territorio di competenza dell’Istituto Zooprofilattico.

I soggetti sospetti “ caso sospetto” dovevano soddisfare i seguenti requisiti: temperatura  $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$  (anche se intermittente) e almeno uno dei seguenti sintomi: anemia, ematuria, emorragie petecchiali, ittero. I soggetti asintomatici sono stati raccolti scegliendoli tra quelli con caratteristiche anamnestiche e di allevamento simili ai casi.

I campioni consistevano in sangue con e senza anticoagulante ed ogni prelievo doveva essere accompagnato da una scheda anamnestica riportata in Allegato 5.

Sui campioni sono state eseguite le seguenti analisi:

- Anaplasma (IFI e PCR);
- Babesia (ELISA, IFI e PCR);
- Theileria (ELISA, IFI e PCR);
- Leptospira (MAT e PCR);
- Anemia Infettiva Equina (ELISA);
- Striscio ematico periferico (esame microscopico);
- AST;
- Creatinina;
- GGT;
- CPK;
- BUN;
- LDH;
- Radicali liberi (D-roms);
- Antiossidanti;
- Bilirubina Totale e Diretta;
- Emocromo completo con formula;
- Conta CD4 e CD8;
- Proteine totali;
- Protidogramma.

Sulla base dei risultati ogni sospetto e controllo è stato classificato come confermato o meno e i casi ulteriormente suddivisi in base al parassita riscontrato. I criteri per la definizione di caso generico e specifico sono presentati in Tabella 12.

È stata effettuata un’analisi descrittiva e associazioni tra fattori di rischio (specie, sesso, razza, attitudine, introduzione recente, età, mantello, stabulazione, vaccinazione, sverminazione e antiparassitari, zecche). Inoltre è stata effettuata un’analisi descrittiva e associazioni tra parametri ematobiochimici vs caso/controllo.

Per ogni sintomo è stata eseguita un’analisi descrittiva stratificata per tipo di caso confermato per numero di sintomi. Per tutte le analisi statistiche è stato considerato come significativo un  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### **WP1- Definire la prevalenza delle infezioni sostenute da *B. caballi*, *T. equi* e *A. phagocytophilum* in popolazioni equine autoctone del Lazio e della Toscana.**

Lo studio è stato condotto su 673 cavalli residenti nelle regioni Lazio, Molise e Campania. Le prevalenze sierologiche e di PCR per entrambi i parassiti e ciascuna provincia sono mostrati in Figura 1. Dei 273 campioni sieropositivi, cinque sono stati esclusi dall'analisi dei risultati in PCR perché contenevano fattori inibenti. La provincia con la più alta sieroprevalenza e il livello di positività in PCR per per entrambi parassiti è risultata Frosinone.

Non è stata rilevata alcuna positività per *Anaplasma phagocytophilum*.

I valori di sieroprevalenza, intervalli di confidenza al 95% ( 95% CI) valori di p dei test statistici ottenuti per ogni variabile inclusa nell'analisi del rischio sono riportati nella tabella 13.

La sieroprevalenza generale per *T. equi* è stata del 39,8% (95% CI:36,0-44,0%), dal 25,0% (Salerno) al 64,6% (Frosinone). In una analisi univariata preliminare condotta per il sesso, con tre categorie (castrone, maschi e femmine), non è stata rilevata differenza tra i primi due gruppi che sono stati pertanto uniti in un'unica categoria per la successiva analisi. Le variabili risultanti significative ( $p \leq 0,05$ ) nel modello univariato sono state sesso, età, razza, l'accesso al pascolo, l'altitudine, la copertura del suolo, il tipo di terreno e la posizione della provincia. In particolare, per sesso ed età, la prevalenza è stata maggiore nelle femmine ( $p < 0,001$ ) e aumenta con età ( $p < 0,01$ ). Relativamente alla razza, la siero prevalenza nella razza mista è stata significativamente più alta ( $p < 0,01$ ) rispetto agli altri due gruppi, seguita dalla razza italiana. In cavalli con accesso al pascolo la differenza è risultata significativa con  $p < 0,01$ . Per l' altitudine, la più alta prevalenza è stata rilevata nel gruppo residente a 150-600 m slm ( $p < 0,01$ ), mentre la prevalenza è stata maggiore nelle province interne che in quelli costiere ( $p < 0,001$ ). Il modello multivariato finale ha incluso sette fattori di rischio: sesso, età, razza, l'accesso al pascolo, la copertura del suolo, tipo di terreno e la posizione provincia (Tabella 14).

Per la positività in PCR i valori di prevalenza in PCR, intervalli di confidenza al 95% ( 95% CI) valori di p dei test statistici ottenuti per ogni variabile inclusa nell'analisi del rischio sono riportati nella tabella 15. Positività in PCR per *T. equi* PCR è stata rilevata nel 70,3% dei campioni (95% CI:

64,6-75,5%), che vanno dal 38,5% (Salerno) al 81,4% (Frosinone). Nell'analisi univariata, sesso, età, razza, l'accesso al pascolo, altitudine, copertura del suolo, zona climatica, tipo di terreno e posizione sono le variabili risultate significative ( $p \leq 0,05$ ). L'andamento delle prevalenze è simile a quantodescritto per la sieropositività con l'eccezione di età e altitudine. Infatti, la positività in PCR diminuisce significativamente con l'età ( $p < 0,001$ ), mentre aumenta con l'altitudine ( $p < 0,05$ ).

I fattori di rischio identificati per questo risultato nella multivariata sono l'età, tipo di terreno e la posizione della provincia (tabella 16).

Per *B. caballi* la sieroprevalenza complessiva è stata del 8,9% (95% CI: 7,0-11,3%), e va da 0% (Napoli, Isernia e Caserta) al 26,8% (Frosinone). Le seguenti variabili sono risultate significative ( $p \leq 0,05$ ) nell'analisi univariata: sesso, razza, l'accesso al pascolo, altitudine, copertura del suolo, zona climatica, tipo di terreno e la posizione della provincia (Tabella 13). Le femmine hanno mostrato una sieroprevalenza significativamente maggiore rispetto ai maschi ( $P < 0,001$ ). Differenze significative ( $p < 0,001$ ) per razzae accesso al pascolo sono simili a quelle descritte per *T. equi* (Tabella 1). Il modello multivariato non è stata eseguita per la prevalenza sierologica di *B. caballi* a causa del basso numero o l'assenza di animali positivi per le diverse variabili. Per la positività in PCR per *B. caballi* la prevalenza è stata del 10,3% del campioni esaminati (95% CI: 7,2-14,5%), e va da 0% (Napoli e Salerno) al 17,6% (Frosinone) (Tabella 15). Le seguenti variabili sono risultate significative ( $p \leq 0,05$ ) nel modello univariato: età, zona climatica, tipo di terreno e la posizione della provincia, la prevalenza diminuisce significativamente con l'età ( $p < 0,05$ ), come mostrato in Tabella 3. La zona climatica e il tipo di terreno sono stati i fattori di rischio associati alla positività in PCR nel modello multivariato (Tabella 16). Tutti i campioni PCR-positivi 44 avevano una

identità di sequenza di  $\geq 98\%$  con le piroplasmi equine depositati in GenBank (vedi analisi filogenetica).

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

Sono stati sviluppati quattro protocolli di diagnosi molecolare per *Babesia caballi* e due protocolli per *Theileria equi*.

Per *Babesia caballi* sono stati sviluppati i seguenti protocolli modificando quelli presenti in bibliografia:

1. PCR RAP1 gene *Babesia caballi* (Bhoora R. et al., 2010). Il kit impiegato è il Gold Taq Polymerase kit (Applied Biosystems ®). La soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 17 e 18 rispettivamente. Il prodotto di PCR consta di un segmento di 825 bp.
2. PCR *Babesia caballi* (Battsetseg B., 2002). Il kit impiegato è il Gold Taq Polymerase kit (Applied Biosystems ®). La soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 19 e 20 rispettivamente. Il prodotto di PCR consta di un segmento di 659 bp
3. Nested PCR specifica per *Babesia caballi* (Battsetseg B., et al. 2002). La Nested Pcr consta di due reazioni. La prima utilizza i primer PRIMER 48F1/R3 *Babesia caballi* e risulta in un prodotto di 530 bp. La seconda reazione utilizza i primer 48F11/R31 e risulta in un prodotto di 430 bp. La soluzione mix utilizzata per ciascuna reazione e il ciclo termico, che è il medesimo per entrambe le reazioni, sono riassunti in Tabella 21 e 22 rispettivamente.
4. REAL TIME PCR *Babesia caballi* (Bhoora R. et al., 2010). Il kit impiegato è il TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e la sonda utilizzata è la FAM-NFQ (Sonda MGB). La soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 1 e 2 rispettivamente. Il target consta di un segmento di 101 bp.

Per *Theileria equi* sono stati sviluppati i seguenti protocolli modificando quelli presenti in bibliografia:

1. PCR END POINT per *Theileria equi* (Battsetseg B. et al., 2002) Il kit impiegato è il Gold TaqPolymerasi Kit<sup>™</sup> (Applied Biosystems ®). La soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 23 e 24 rispettivamente. Il prodotto consta di un segmento di 218 bp.
2. REAL TIME PCR *Theileria equi* (Kim C., 2008). Il kit impiegato è il TaqMan<sup>™</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems ®). La sonda è VIC – TAMRA. La soluzione mix utilizzata e il ciclo termico sono riassunti in Tabella 9 e 10 rispettivamente. Il target consta di un segmento di 81 bp.

### **Clonaggi**

Per *Babesia caballi* nelle prove con il primo tipo di clonaggio soltanto il plasmide numero 22 è risultato idoneo ai sequenziamenti. Attualmente è in corso la costruzione della curva standard utilizzando il plasmide 22. Per quanto riguarda il secondo tipo di clonaggio soltanto il plasmide numero 2C è risultato idoneo ai sequenziamenti. Attualmente è in corso la costruzione della curva standard utilizzando il plasmide 2C. Per il coagulo 26220 attualmente è in corso la costruzione della curva standard.

Per *Theileria equi* nelle prove con il primo tipo di clonaggio soltanto i plasmidi numero B e C sono risultati idonei ai sequenziamenti. Attualmente sono in corso le costruzioni delle curve standard utilizzando i plasmidi B e C. in cui è stata clonata la regione ipervariabile V4 in cui si trova il target della Real Time T.equi (18S). Per quanto riguarda il secondo tipo di clonaggio attualmente è in corso la costruzione della curva standard. Il terzo tipo di clonaggio per T. equi non è riuscito nonostante anche sia stato effettuato il tentativo di aggiunta della 3'A-Overhangs Post-Amplification come consigliato dal kit TOPO TA Cloning (Invitrogen).

I risultati del confronto preliminare tra i protocolli sviluppati sono mostrati nelle Tabelle 25, 26 e 27 rispettivamente. È stata rilevata una concordanza totale del 91.3% per B. caballi e 90.3% per T equi. I due protocolli di PCR real time sono risultati i migliori dal punto di vista diagnostico

In Tabella 28 sono mostrate le percentuali di positivi rilevati da ogni ciascun test all'interno dell'intero campione (totale), dei casi sospetti e del gruppo degli asintomatici. La stessa lettera apice (per B. caballi) o un numero (per T. equi) indica, all'interno della stessa colonna, la differenza statistica tra i test ( $p < 0.05$ ). Le proporzioni di positivo è calcolata sul numero totale di campioni analizzati, mentre l'analisi statistica è stata effettuata per ogni coppia di test su campioni con risultati per entrambe le tecniche.

In Tabella 29 sono mostrati i valori di concordanza totale e concordanza su campioni positivi (tra parentesi) tra ogni coppia di test per l'intero campione di popolazione (totale), per i casi sospetti e per gli asintomatici. La metà inferiore si riferisce a B. caballi, quella superiore a T. equi.

Nel Grafico 1 sono mostrati i contributi nel rilevare la positività per B. caballi (a) e T. equi (b), in termini di percentuale cumulativa, dei due metodi sierologici (IFAT, ELISA e Fuller® VMRD ®) e di PCR (PCR Genesig ® e della letteratura, Kim et al., 2008, Bhoora et al., 2010), su 274 campioni di equidi in quattro algoritmi diagnostici ipotetici in cui solo i negativi al test precedente sono analizzati con il successivo. In ordine di esecuzione A: ELISA, IFAT, PCR Genesig ® , PCR Letteratura; B: ELISA, IFAT, Letteratura PCR, PCR Genesig ® ; C: IFAT, ELISA, PCR Genesig ® , PCR Letteratura; D: IFAT, ELISA, PCR Letteratura, PCR Genesig ® .

In Tabella 30 è riportato l'algoritmo diagnostico proposto per la diagnosi di piroplasmosi equine.

L'analisi filogenetica svolta basata sulla distanza e omologia ha dimostrato che sia T. equi e B. caballi presentano 3 gruppi diversi.

Il gruppo 1 contiene sequenze omologhe alle prime sequenze di piroplasmai registrate su GenBank (Z15105, Z15104), il gruppo 2 comprende forme "like" (AY534882, AY534883) e il gruppo 3 contiene sequenze con omologia equidistante dai gruppi uno e due (AB515315, EU642514).

Per quanto riguarda la *Babesia caballi* 5 campioni appartenevano al gruppo 1, 2 al gruppo 2 e 2 al gruppo 3, ottenute tutte da campioni di cavallo; invece per *Theileria equi* 41 sequenze appartenevano al gruppo 1, 38 al gruppo 2 e 15 al gruppo 3. Per specie, le 71 sequenze di cavalli sono state distribuite: 40 nel gruppo 1, 26 nel gruppo 2 e 5 nel gruppo 3. Negli asini 1 apparteneva al gruppo 1, 12 al gruppo 2 e 10 al gruppo 3.

L'analisi statistica delle sequenze di *Theileria equi* ha mostrato differenze significative tra i gruppi legati alla presenza di sintomi (60 asintomatici e sintomatici 34): sequenze appartenenti al gruppo 1 sono trovate di più in animali sintomatici che in animali asintomatici.

La discordanza tra prove sierologiche e PCR (32 campioni) è stato anche un fattore significativo, essendo le sequenze del gruppo 1 più presenti in animali sieronegativi, gli animali sieropositivi presentavano per lo più sequenze dei gruppi 2 e 3. Differenze significative tra i gruppi sono state rilevate in rapporto con i risultati della EMA di PCR, molto debole positività o negatività (42 campioni) erano per lo più presenti nei gruppi 2 e 3. 22 campioni presentavano coinfezione (positivi per entrambi i protocolli di real time, anche se non tutti potevano essere sequenziati), ma non è stato un fattore significativo.

L'analisi statistica effettuata su sequenze V4 di *Babesia caballi* non ha mostrato valori significativi, questo può essere dovuto al limitato numero di campioni.

Maggiori dettagli circa i risultati statistici possono essere trovati nella Tabella 31.

Poiché la maggior parte degli asini erano asintomatici (21/23), al fine di evitare potenziali bias associato con collinearità, la specie non è stata un fattore considerato.

Le sequenze consensus assemblate e scelte per la costruzione dell'albero filogenetico di T. equi sono state analizzate ed è stata riscontrata una regione di 351 nucleotidi interna alla V4 18S rRNA altamente conservata. Questa regione di 351 nucleotidi ha mostrato specifiche sostituzioni nucleotidiche localizzate tra il nucleotide 172 ed il nucleotide 242, presentando 36 SNP (single nucleotide polymorfism). Tutte le V4 18SrRNA sequenze appartenenti al gruppo 1, fra di loro, hanno una identità di sequenza del 99.8%; le sequenze appartenenti al gruppo 2 (che nell'albero sembra suddividersi) condividevano una identità di sequenza del 99,5% e le sequenze appartenenti al gruppo 3 mostravano fra di loro una identità di sequenza del 99,1%. Le sequenze consensus tra i gruppi sono omologhe al 92%.

Sequenze registrate su GenBank per T. equi V4:

Gruppo 1: KU923625, KU923627, KU923638, KU923639, KU923640, KU923641, KU923642, KU923643, KU923644, KU923645, KU923646, KU923647, KU923648, KU923649, KU923650, KU923651, KU923652, KU923653, KU923654, KU923655.

Gruppo 2 KU923615, KU923616, KU923617, KU923618, KU923619, KU923620, KU923621, KU923622, KU923623, KU923624, KU923626, KU923628, KU923656, KU923657, KU923658, KU923659, KU923660, KU923661, KU923662, KU923663.

Gruppo 3: KU923629, KU923630, KU923631, KU923632, KU923633, KU923634, KU923635, KU923636, KU923637.

In Figura 2 è mostrato l'albero filogenetico per T. equiV4

Le sequenze consensus assemblate e scelte per la costruzione dell'albero filogenetico di B. caballi sono state analizzate ed è stata riscontrata una regione di 299 nucleotidi interna alla V4 18S rRNA altamente conservata. Questa regione di 299 nucleotidi ha mostrato specifiche sostituzioni nucleotidiche localizzate tra il nucleotide 124 ed il nucleotide 176 e tra il 243 e il 245 e poi tra I nucleotidi 276 e 280, in totale 23 SNP. Tutte le V4 18SrRNA sequenze appartenenti al gruppo 1, fra di loro, hanno una identità di sequenza del 100%; le sequenze appartenenti al gruppo 2 condividevano una identità di sequenza del 99.7% e le sequenze appartenenti al gruppo 3 mostravano fra di loro una identità di sequenza del 99.8%. Le sequenze consensus tra i gruppi sono omologhe nel 96%.

Sequenze registrate su GenBank per B.caballi V4

Gruppo 1: KU923669, KU923668, KU923667

Gruppo 2: KU923664

Gruppo 3: KU923665, KU923666

In Figura 3 è mostrato l'albero filogenetico per B. caballi V4

Le zecche trovate sono state identificate come Dermacentor marginatus, delle 26 zecche 15 sono risultate positive alla PCR EMA di cui 13 sono state utilizzate per la costruzione di alberi insieme a 15 sequenze EMA di cavalli. Non ci sono rappresentanti del gruppo 3 tra i campioni, 2 sequenze da cavalli appartengono al gruppo 2 e il resto (tutte le zecche e 13 cavalli, tra cui i campioni di aborto e fattrice sintomatica) al gruppo 1.

Le sequenze consensus assemblate e scelte per la costruzione dell'albero filogenetico della porzione del gene che codifica per l'antigene 1 del merozoite di Theileria equi sono state analizzate ed è stata riscontrata una regione di 69 amminoacidi molto conservata. Le sequenze del gruppo 2 presentano differenze con quelle degli altri gruppi in 4 amminoacidi, nel gruppo 1, 4 delle 7 sequenze presentano una mutazione amminoacidica., l'omologia tra le sequenze del gruppo 2 è del 100% e tra quelli del gruppo 1 del 99.8%. L'omologia tra il gruppo 1 e 3 e 1 e 2 è del 99% mentre tra il gruppo 1 e 3 del 93%. Le sequenze consensus assemblate e scelte per la costruzione dell'albero filogenetico della porzione del gene che codifica per l'antigene 1 del merozoite di Theileria equi sono state analizzate ed è stata riscontrata una regione di 69 amminoacidi molto conservata. Le sequenze del gruppo 2 presentano differenze con quelle degli altri gruppi in 4 amminoacidi, nel gruppo 1, 4 delle 7 sequenze presentano una mutazione amminoacidica., l'omologia tra le sequenze del gruppo 2 è del 100% e tra quelli del gruppo 1 del 99.8%. L'omologia tra il gruppo 1 e 3 e 1 e 2 è del 99% mentre tra il gruppo 1 e 3 del 93%.

Non si è trovata corrispondenza tra i gruppi di V4 e i gruppi di EMA.

Sequenze EMA registrate su GenBank:

Gruppo 1: KU923588, KU923589, KU923590, KU923591, KU923592, KU923593, KU923594, KU923595, KU923596, KU923597, KU923598, KU923599, KU923600, KU923602, KU923603, KU923604, KU923605, KU923606, KU923607, KU923608, KU923609, KU923610, KU923611, KU923612, KU923613, KU923614

Gruppo 2: KU923587, KU923601.

In Figura 4 è mostrato l'albero filogenetico per EMA

### **WP 3 “Studio caso/controllo per l’identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi”**

Nelle tabelle 32-34 sono riassunte le caratteristiche anamnestiche dei soggetti reclutati nella ricerca, il tipo di sintomi presenti ed il loro numero per soggetto.

Nella tabella 35 sono riassunti i risultati delle analisi sierologiche e biomolecolari effettuate.

Nei Grafici da 2 a 7 sono presentati i risultati relativi all’andamento dei parametri ematologici, biochimici e del protidogramma nel gruppo dei casi e nei controlli.

Nelle tabelle 36, 37 e 38 sono riportati i risultati dell’analisi statistica per correlare i fattori anamnestici, i sintomi e le analisi di laboratorio alla positività sia generica che specifica.

I fattori di rischio correlati allo stato di caso generico di piroplasmosi sono risultati i seguenti: sesso, stabulazione, razza, attitudine, classe di età, presenza di vaccinazione e presenza di zecche., invece per quanto riguarda il caso specifico sono risultati significativi solo la presenza di zecche, la razza e la stabulazione singola o in gruppo. I parametri ematobiochimici correlati allo stato di caso di piroplasmosi sono risultati essere: la bilirubina totale e indiretta, il numero di globuli bianchi, i neutrofilii segmentati (%), i linfociti, i monociti, i basofili, (assoluto e in %), il numero di globuli rossi, l’ematocrito, l’emoglobina, le piastrine, la frazione alfa 2 e le gamma; mentre per il caso specifico solo la bilirubina indiretta, i globuli bianchi, l’emoglobina e l’ematocrito.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

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

In questo studio, 673 campioni di equini asintomatici sono stati inizialmente esaminati per determinare la sieroprevalenza per ciascun piroplasma. Successivamente, 273 campioni sieropositivi sono stati testati in PCR. Questi risultati sono stati poi utilizzati per identificare i fattori di rischio associati. La sieroprevalenza per *T. equi* è stata del 39,8%, in linea con quelli di altri studi effettuati in Italia utilizzando IFAT, dove i valori di prevalenza segnalati erano 41,0% (Laus et al., 2013) e il 50,5% (Moretti et al., 2010), e in alcuni paesi del Mediterraneo, con il 33,7% in Israele (Shkap et al., 1998) utilizzando un cELISA in-house e 50,3% in Spagna (García-Bocanegra et al., 2013) utilizzando ELISAc VMRD®. Nel nostro studio, i risultati ottenuti indicano che i fattori che influenzano la prevalenza sono apparentemente omogenei in tutta l'area geografica di interesse, anche se piuttosto ampia in estensione. La percentuale di positività in PCR per *T. equi* è risultata del 70,3%, anche se analoghi studi condotti in Italia descrivono percentuali inferiori (Grandi et al., 2011, Moretti et al., 2010) che possono essere attribuite alle diverse PCR impiegate e alla scelta del target, che sono fattori che influenzano la sensibilità del metodo. La sieroprevalenza per *B. caballi* è stata dell'8,9%, in conformità con i risultati di uno studio spagnolo (8,4%) (García-Bocanegra et al., 2013) ma superiori a quelli di altri studi che erano intorno al 2%, in Grecia (Kouam et al., 2010) e in Turchia (Sevinc et al., 2008). Nel nostro caso, la sieroprevalenza maggiore potrebbe essere dovuto a un cluster di infezione sui Monti Aurunci, discusso più in dettaglio di seguito. D'altra parte, studi italiani utilizzando IFAT descritti da Laus et al. (2013) e Moretti et al. (2010), riportano rispettivamente valori di prevalenza nettamente superiori, il 26% e il 56%, che potrebbe essere collegato sia alla posizione delle loro aree di studio, o alle caratteristiche del test. La percentuale di positività in PCR per *B. caballi* è stata del 10,3%, più alto che in altri studi effettuati nello stesso paese (Grandi et al., 2011, Moretti et al., 2010). Le considerazioni proposte per la positività in PCR per *T. equi* potrebbero anche essere valide per *B. caballi*, in riferimento al cluster di infezione precedentemente suddetto, rilevato anche per questo parassita. Questo cluster di infezione era situato sui Monti Aurunci, un parco regionale, la posizione dei quali è mostrato in Fig. 1, che vanno 30-1535 m s.l.m., che ospita una grande varietà di flora (faggio, quercia, mele, castagne, aceri) e fauna, tra cui ospiti e vettori delle piroplasmosi. Novantaquattro campioni sono stati raccolti da cavalli in questa zona, e per *B. caballi*, 43 (45,7%) sono risultati seropositivi e 16 (37%) PCR positivi, mentre per *T. equi*, 75 (79,8%) sieropositivi e 66 (88%) erano PCR positivi. Questo gruppo di positività potrebbe essere attribuito alle caratteristiche del territorio particolarmente favorevole al mantenimento di un elevato numero di infezioni asintomatiche da piroplasma equine, probabilmente a causa di assenza di gestione e una particolare adattabilità dei cavalli presenti in quest'area per questi parassiti. Il sesso è risultato un fattore di rischio comune a entrambi i parassiti, con le femmine che mostrano una positività più alta rispetto ai maschi. Come già proposto in un altro studio (Rüegg et al., 2007), la differenza osservata da noi potrebbe essere dovuta alle pratiche di gestione specifici di genere. Nel modello multivariato le femmine hanno mostrato un odds ratio (OR) di 1.86 per la sieroprevalenza per *T. equi*. Risultati simili sono stati osservati da Moretti et al. (2010), ma non sono stati discussi. Le differenze legate all'età sono stati significative nell'univariata per positività in PCR per *B. caballi* e nel modello multivariato per *T. equi* (sieroprevalenza e positività in PCR). Per *B. caballi*, la positività in PCR diminuisce con l'età, che potrebbe essere attribuito ad una clearance parassitaria che si verifica in circa 4 anni, con la conseguente scomparsa di anticorpi (De Waal, 1992). Questi dati sembrano essere in linea con quanto descritto in uno studio precedente (Rüegg et al., 2007), in cui, oltre alla clearance, la localizzazione di *B. caballi* a livello del microcircolo è stata ipotizzata per spiegare la diminuzione età-dipendente della positività in PCR. Un'alternativa a tale ipotesi potrebbe essere che i cavalli più anziani diventano più efficienti nell'eliminare o mantenere il carico parassitario inferiore al limite di rilevabilità della PCR, a causa di una immunità celluloso-

mediata. Inoltre, secondo Rüegg et al. (2008), quando un cavallo elimina l'infezione da *B. caballi*, il tempo medio di re-infezione è in l'ordine di 14 anni, difficilmente si verifica in una specie con una aspettativa di vita di circa 20 anni. Diversamente, per *T. equi* la sieroprevalenza aumenta con l'età, con il gruppo più anziano che mostra un OR di 2.59, rispetto al baseline, causato da uno stato cronico (De Waal, 1992) con un effetto cumulativo di positività. Queste osservazioni sono in accordo con altri autori (Kouam et al, 2010; García-Bocanegra et al 2013). Tuttavia, per la positività in PCR per *T. equi*, l'OR diminuisce con l'età, in contrasto con uno studio precedente effettuato in Mongolia, che ha evidenziato un aumento età-dipendente di questo risultato (Rüegg et al., 2008) e con lo studio di Steinman (2012) in Israele, che non ha segnalato nessuna differenza significativa all'interno delle classi di età considerate. Le condizioni che influenzano la presenza di *T. equi* nel sangue, durante la vita un cavallo, richiedono ulteriori verifiche per appurare se è influenzata dalla sensibilità dei vari metodi utilizzati nei diversi studi o da interazioni ospite-parassita. Differenze significative associate alle razze equine sono state rilevate nella univariata per sieropositività per *B. caballi* e per la positività in PCR per *T. equi*, mentre nell'analisi multivariata solo per quest'ultima è risultata significativa. La razza italiana e cavalli di razza mista rispettivamente, ha avuto un OR di 3.57 e 2.51 di essere sieropositivi per *T. equi* rispetto ai cavalli di razze estere. Queste differenze potrebbero essere correlate a varie pratiche di gestione, dato che le condizioni di allevamento delle razze estere potrebbero portare ad una minore esposizione alla PE, anche se altri gli autori hanno ipotizzato che le differenze di sensibilità potrebbero esserci differenti di suscettibilità dipendenti dalla razza (Steinman et al., 2012, Sevinc et al., 2008). Dato che tutti i cavalli inclusi nello studio erano sani e asintomatici, questo indica un grado di tolleranza e resistenza alle malattie da zecche. Le razze miste sono solitamente più robuste mentre le razze locali sono più adattate al loro ambiente. In uno studio condotto sulla diversità genetica del complesso maggiore di istocompatibilità in asini, legati alla resistenza alle Piroplasmosi Equine, gli autori riportano che è associato con gli effetti dell'allevamento e con la diversa origine genetica delle popolazioni studiate, piuttosto che da una selezione indotta dal patogeno (Vranova et al., 2011). Uno studio simile nei cavalli aiuterebbe a chiarire se i nostri risultati sono confrontabili con il risultati di Vranova et al. (2011). L'accesso al pascolo è una variabile significativa nel modello univariato per la sieropositività per *B. caballi* e *T. equi* e per la positività in PCR per *T. equi* mentre con l'analisi multivariata è risultato significativo solo per la sieroprevalenza per *T. equi*. Analogamente a quanto osservato da altri autori (Kouam et al, 2010; García-Bocanegra et al, 2013; Shkap et al., 1998, Moretti et al., 2010, Steinman et al., 2012), i cavalli che hanno disposizione i pascoli hanno 2,22 volte più probabilità di essere sieropositivi a *T. equi*, presumibilmente a causa di una maggiore esposizione al vettore o per mancanza di grooming che aiuta la rimozione della zecca. L'altitudine è risultata significativa solo nel modello univariato per la sieroprevalenza di entrambi i piroplasmidi e per la positività in PCR per *T. equi*. Il maggior numero di sieropositivi sono stati trovati per entrambi i parassiti a 150-600 m slm, mentre la positività in PCR per *T. equi* questa condizione si trova alla categoria > 600m slm. Nel nostro caso, la differenza di altitudine e risultati potrebbero essere associati con un effetto stagionale sulla presenza di zecche e la prevalenza di positività in PCR. Lo spostamento dei cavalli tra le diverse categorie di altitudine potrebbe anche influenzare il risultato di questa variabile ma è stata considerata irrilevante perché gli animali erano confinati. La copertura del suolo è risultata significativa nelle analisi univariate per la sieroprevalenza di *B. caballi* e per la positività in PCR per *T. equi*. con una più alta prevalenza rispettivamente negli animali che vivono in zone miste (con nessun predominio di un particolare terreno) e nelle zone con copertura forestale superiore al 75%. Nel modello multivariato per la sieropositività per *T. equi*, la copertura del suolo è risultata ancora una variabile significativa, con un OR di 0,42 nel 50-75% di bosco rispetto al > 75% di foresta. Questi risultati sono in linea con quelli descritti da Vanwambeke et al. (2010) in cui l'autore ha riferito che campi coltivabili o macchie di boschi, circondati da terreni agricoli, hanno un impatto favorevole sul controllo delle malattie trasmesse da vettori, contrariamente a quelli con un'alta percentuale di foresta, molto probabilmente perché rappresentano un ambiente meno adatto per la presenza di zecche, dato il loro uso agricolo. La zona climatica nell'analisi univariata è risultata significativa per la sieroprevalenza e

positività in PCR per *B. caballi* e per la positività in PCR per *T. equi*, mentre l'analisi multivariata è risultata significativa solo per la positività in PCR per *B. caballi*. Per entrambi i risultati per *B. caballi*, la zona sub-umida (LGP 180-269 giorni) ha rivelato livelli di prevalenza più elevati e un OR di 3.55 per la positività in PCR. La zona semiarida-umida (LGP 120-179) ha avuto una più alta prevalenza di positività in PCR per *T. equi* nell'analisi univariata. Nel nostro caso, un numero maggiore di campioni potrebbe aiutare confermando questi risultati. Il tipo di terreno è stata una variabile significativa per entrambi i piroplasmi per i risultati analizzati nell'analisi univariata e multivariata. Nell'analisi univariata, per entrambi i parassiti e per entrambe le tecniche, il gruppo luvisol cromatico ha mostrato il maggior numero di siero / PCR-positivi. Nel modello multivariato per *T. equi*, i soggetti appartenenti al gruppo luvisol cromatico presentavano un OR di 3.16 (sieropositività) e 4,55 (positività in PCR), mentre quelli del gruppo Dystric ha mostrato una significativa OR di 3.58, solo per il l'esito in PCR per *T. equi*. Al contrario, nel modello multivariato, per l'esito in PCR per *B. caballi*, il gruppo Dystric ha mostrato un OR <1 rispetto al riferimento e non sono state rilevate differenze tra il luvisol cromatico e il gruppo Eutric. Questo risultato indica l'importanza dell'influenza di tipo terreno sull'interazione tra ospite, parassita e ambiente. Stando alle nostre conoscenze, non vi sono studi che includono il tipo di terreno con questa classificazione in studi simili ai nostri, però Schwarz et al. (2009) discute l'influenza indiretta del tipo di terreno sulla vegetazione e la distribuzione di zecche. Mentre la copertura del suolo e uso del suolo devono essere la prima scelta, in assenza di informazioni specifiche, una variabile correlata come il tipo di terreno è stata inclusa. Le province interne hanno mostrato un OR, rispettivamente, di 2.5 per sierologico e 2.9 per positività in PCR per *T. equi* rispetto alle province costiere, ciò potrebbe essere attribuito ad un habitat più adatto al vettore, dato che le province interne tendono ad avere una maggiore altitudine e maggiore copertura forestale rispetto alle costiere. I nostri dati indicano che i livelli di sieroprevalenza e positività in PCR per Piroplasmi Equine sono influenzati dalle caratteristiche abiotiche e biotiche e dalle loro interazioni, che determinano la popolazione di zecche e di conseguenza il livello di esposizione agli agenti patogeni. Il clima, il microclima, l'umidità, la temperatura del suolo e la dimensioni dei pori, l'altitudine, l'urbanizzazione e l'adattamento delle zecche a nuovi ambienti e infine la presenza dell'ospite sono stati descritti da Pfäffle et al. (2013) come legati alla distribuzione, l'abbondanza e il comportamento delle zecche. Tutti questi fattori sono essenziali per il mantenimento costante dei vettori (Scoles e Ueti, 2015). Sebbene alcune delle variabili considerate nel presente studio erano significative nell'analisi univariata, ma non nella multivariata, è importante che siano ancora presi in considerazione dato che potrebbero avere un comportamento diverso in altre condizioni di studio o quando analizzati con diversi fattori di rischio. Una conferma di ciò è che per alcuni dei fattori di rischio valutati, altri autori hanno riportato diversi risultati statistici (Steinman et al., 2012). Tra i fattori di rischio che dovrebbero essere indagati, sarebbe molto importante includere anche le specie di zecche presenti nella zona di studio e relativi parametri, come la copertura del suolo e uso del suolo, anche se le informazioni su questi parametri è raramente presente.

In conclusione questo studio definisce la presenza di una elevata sieroprevalenza e di un elevato numero di malattia asintomatica in cavalli PCR-positivi per entrambi i parassiti, con un cluster nella regione Lazio. Diversi fattori di rischio associati con l'ospite e l'ambiente sono risultati significativamente correlati alla positività per Piroplasmi Equine, confermando le osservazioni di studi precedenti nell'area del Mediterraneo. Però, ulteriori indagini sull'influenza dei fattori ambientali sono necessarie e in particolare sull'ecologia e la distribuzione di zecche in quest'area. Anche se il trattamento farmacologico e la profilassi per Piroplasmi Equine sono disponibili, gli effetti collaterali di questi interventi possono portare a complicazioni gravi come epatotossicità e nefrotossicità (Donnellan e Marais, 2009). Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, programmi di controllo potrebbero essere sviluppati, in particolare sulla base dei fattori di rischio con l'adozione di pratiche idonee, tra cui controllo delle zecche, utilizzo del territorio ed adeguatezza della gestione del cavallo. Tali misure preventive sarebbero utili nel limitare gli interventi farmacologici, e ridurre la probabilità di stabilire resistenza parassitaria.

## **WP 2 “Realizzazione di un protocollo diagnostico impiegato per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica per le sindromi anemico/emolitiche dell’equino”;**

Due premesse generali sono necessarie prima di discutere i risultati rispetto ad altri studi. Anche se alcuni autori hanno riportato dati sulla concordanza tra risultati sierologici e bio molecolari (Abedi et al, 2014;.. Jaffer et al, 2010), è opinione degli autori di questo studio che questi confronti non diano più informazioni utili per i professionisti, perché una bassa concordanza è previsto in un'area endemica e in caso di infezioni recenti, dove la positività per un tipo di tecnica prevale sull'altro. I risultati invece dovrebbero essere interpretati separatamente in un algoritmo per valutare lo stato sanitario, come proposto in Tabella 30. Nella tabella 29 la concordanza tra i test sierologici e PCR sono riportate, ma, per i motivi già esposti in precedenza, non discussa. La concordanza è normalmente valutata in base alla tabella proposta da Landis e Kock, (1977) per la statistica K, che la classifica in 6 gradi, da scarsa a quasi perfetta (0,81-1). Un valore di 0,81 significa che circa il 20% dei campioni potrebbe non essere ugualmente classificato da due test, che è considerato inaccettabile, dagli autori di questo studio, per uno scopo diagnostico o di sorveglianza: pertanto nel presente studio il valore di soglia di accettabilità è stato fissato a 0,95. Il kit cELISA Commerciale per B. caballi è risultato significativamente meno sensibile dell'IFAT e con un disaccordo completo per i positivi con quest'ultimo, in tutti i gruppi di animali. Questi dati sono in contrasto con Jaffer et al, (2010) che ha eseguito uno studio a Dubai, e rilevato un accordo tra positivi di 0,69.; ma in accordo con lo studio di Kamyngkird et al., (2014) in Thailandia, in cui l' IFAT ha rilevato una prevalenza due volte superiore a quella dell'cELISA con nessun accordo sui positivi. Gli autori hanno affermato che la maggiore prevalenza in IFAT avrebbe potuto essere attribuita a reazioni non specifiche, ma nel presente studio alcuni dei campioni cELISA- / IFAT+ sono stati confermati da almeno una PCR e in alcuni casi anche da un esame microscopico, rafforzando così l'ipotesi di un minore sensibilità dell'cELISA. Diverse le ipotesi potrebbero essere proposte per spiegare questi dati. Questi dati sono una conferma dello studio di Bhoora et al (2010) in Sud Africa, in cui cELISA non è riuscito a rilevare 63 campioni positivi IFAT.; ed evidenzia un problema di sensibilità, oltre al problema di specificità evidenziato già da Awinda et al., (2013). Kappmeyer et al., (1999), che descrive lo sviluppo del metodo, aveva già segnalato un 6,5% di campioni cELISA- e IFAT +, appartenenti a diverse regioni del mondo, e suggerisce che non vi era alcuna correlazione tra ceppo del parassita e mancanza di reattività, anche se non ha dato ipotesi alternativa nella carta. Nel presente studio su 376 campioni cELISA- 50 (13,3%, il doppio della percentuale rilevata dal Kappmeyer et al., (1999)) erano IFAT + e su 331 campioni IFAT- 5 erano cELISA +. Una differenza significativa è stata rilevata sia nel gruppo degli asintomatici che in quello dei sintomatici, suggerendo alcuna correlazione tra la presenza di sintomi e le caratteristiche di reattività. Anche in caso di malattia manifesta, una differenziazione tra forme croniche acute e riattivate non è stata possibile, per la mancanza di dati storici dei soggetti al momento del campionamento, suggerendo che forse la reazione sierologica potrebbe essere meglio correlata al periodo tra il campionamento e il tempo in prima infezione, indipendentemente dalla riattivazione. Questo intervallo di tempo probabilmente conduce ad una variazione antigenica delle membrane degli eritrociti infetti, già riportati per altri membri del genere Babesia da Allred (2001), al fine di sopravvivere al sistema immunitario dell'ospite, con conseguente modifica della configurazione delle immunoglobuline e la diminuzione degli anticorpi di sotto del limite di rilevazione del test cELISA. Essendo l'IFAT eseguita su eritrociti infetti è possibile che riveli una più ampia gamma di anticorpi. Probabilmente i campioni utilizzati per validare il metodo con Kappmeyer et al., (1999) appartenevano a cavalli recentemente infettati, e con una forte reazione immunitaria contro l'antigene utilizzato nel cELISA. Studi simili a quella da Allred et al., (1994) dovrebbero essere eseguiti su B. caballi per verificare se attuano gli stessi meccanismi di B. bovis. Un'ipotesi alternativa è che il parassita presente in Italia abbia una eterogeneità sulla sequenza di RAP-1, rispetto al ceppo degli Stati Uniti d'America (sequenza: AF0292736, Kappmeyer et al, (1999)), immunologicamente rilevante e che porta ad una diversa sequenza di aminoacidi, con un sito di legame alterato o assente e conseguente produzione di anticorpi che non riconoscono l'antigene del cELISA.

Nel presente studio non sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra i test sierologici per T. equi in tutti i gruppi studiati, anche se i valori di concordanza non sono stati soddisfacenti, essendo 0,79 a livello globale e 0,59 per i positivi. In studi precedenti, Jaffer et al., (2010) ha riportato una concordanza generale tra IFAT ed cELISA di 0,99 e un valore pari a 0,97 entro positivi, mentre Shkap et al., (1998) ha riportato un accordo di 0.96. Anche se i kit IFAT impiegati non sono uguali tra i tre studi, in tutti gli studi sono stati impiegati vetrini con eritrociti infettati, e si può presumere che siano preparati con lo stesso metodo standardizzato; così queste notevoli differenze tra gli studi e i metodi necessitano ulteriori indagini. Dato che nel presente studio il numero di campioni analizzati è stato da 5 a 10 volte superiore rispetto agli altri studi (1300 rispetto a 263 e 105), presumibilmente la stima è più precisa, e ha mostrato un numero rilevante di campioni che sono + solo cELISA (34) o ad IFAT (45). È interessante sottolineare che il 34 cELISA + solo 5 erano positivi ad una PCR, mentre di 45 IFAT + 33 erano positivi ad una PCR, suggerendo che probabilmente i risultati IFAT è meglio correlata alla presenza di parassita. Questi dati sono in disaccordo con Farkas et al. (2013), il quale ha riferito che i due saggi rilevano la stessa prevalenza e potrebbero essere spiegate, come già proposto da Schelp et al. (1995) per il Brasile e il Marocco, con una differenza in sequenza tra ceppi di parassiti. Un confronto accurato tra strisci di sangue e saggi sierologici non può essere discusso, dato che il risultato per la valutazione microscopica era la presenza o assenza di entrambi piroplasmii, ma vale la pena di sottolineare che, a livello descrittivo, su 2 campioni con uno striscio di sangue positivo, negativo a tutte le analisi per T. equi, e positivo alla PCR per B. caballi - e quindi assunti di essere infettati solo da B. caballi-, nessuno è stato rilevato come positiva da parte della cELISA per B. caballi e solo uno da IFAT (sulla secondo campione non è stato eseguito). Tra i campioni positivi solo per T. equi l'IFAT ha rilevato 9 positivi out 11 mentre cELISA solo 2 su 11. Questi risultati sono controintuitivo, dato che la prova sierologica, salvo in caso di infezioni precoci, dovrebbe essere più sensibile rispetto allo striscio di sangue, come Sevinc et al. , (2008) riportano in Turchia, e conferma ulteriormente i problemi di sensibilità dei test sierologici, cELISA in particolare, anche se meno grave per T. equi, come un'interferenza importante con efficacia nel controllo delle piroplasmosi equine. Nonostante che i risultati sierologici non sembrino mostrare una tendenza diversa tra i gruppi sintomatici e asintomatici; una differenza significativa tra i saggi biomolecolari è stata rilevata nel gruppo totale e negli asintomatici, in cui, per entrambi piroplasmii, la PCR dalla letteratura ha rilevato più positivi delle commerciali. In assenza di un Gold Standard solo il sequenziamento può confermare la specificità degli isolati, e, nella quantità limitata di campioni su cui è stata eseguita, la percentuale di identità di sequenza è alto. Questo dato è stato confermato anche confrontando le sequenze amplificate da ciascuna coppia di primers con quelle depositate su Gene Bank, che esclusi cross-reattività tra le due rtPCRs (dati non mostrati). Le differenze possono essere correlate al diverso limite di rilevazione delle PCR, più elevato nelle PCR letteratura di quelli commerciali, considerando che nel gruppo asintomatici il carico parassitario è bassa dato che i parassiti potrebbero essere sequestrati nel microcircolo. Questo potrebbe essere importante più per B. caballi, per il quale entrambe le PCR, commerciali e dalla letteratura, hanno lo stesso target.

La real time PCR per T. equi ha un target differente dato che la commerciale amplifica una regione di Ema-1, mentre la PCR dalla letteratura una porzione del gene 18S. I nostri risultati sono in accordo con lo studio di Bhoora et al., (2010), in cui 20 campioni provenienti dal Sudafrica sono risultati negativi ad una PCR per Ema-1 gene e positivi alla PCR per 18s gene, supportando l'ipotesi che l'eterogeneità di sequenza potrebbe la ragione per i risultati discrepanti, dato che 99 campioni PCR dalla letteratura +/PCR commerciale - erano anche sierologicamente positivi. La sequenza amplificata dal kit commerciale non è nota, ma, anche se il produttore riporta che "i primer e le sequenze della sonda hanno il 100% di omologia con una vasta gamma di sequenze T.equi sulla base di un'analisi completa bioinformatica" (Theileria equi Equi merozoite antigene 1 gene (ema-1); Genesig® standard Kit Handbook), uno studio di conferma è in corso. I risultati di questo studio indicano che l'evoluzione dell'infezione, considerato da un punto di vista immunologico e parassitario, insieme alla sensibilità e specificità del test diagnostico possono influenzare l'efficacia e la precisione della diagnosi di EP. La presenza di reazioni incrociate e problemi di sensibilità /

specificità dei diversi test disponibili deve essere sempre tenuto presente quando si interpretano i risultati di laboratorio. Anche se il cELISA è un test prescritto per il commercio internazionale l'analisi dei quattro percorsi diagnostici ha dimostrato che è completamente inutile per la diagnosi sierologica della B. caballi mentre ancora utile per T. equi, anche se deve essere combinato con IFAT. L'uso contemporaneo di due test sierologico per T. equi, considerando che le diverse nazioni non hanno scelto in modo uniforme il test da impiegare e che vi è spesso una verifica del risultato di laboratorio da parte del Paese importatore; è fortemente consigliabile per evitare risultati discordanti e le perdite economiche. Insieme, i due test sierologici, anche se non sono state rilevate differenze significative nella prevalenza, sono in grado di identificare un maggior numero di positivi, come alcuni campioni IFAT-/cELISA+ e viceversa. I metodi biomolecolari hanno dimostrato di essere di primaria importanza per rilevare le infezioni precoci che potrebbero non essere rilevate da una prova sierologica, quindi, campioni di siero e sangue EDTA dovrebbe essere sempre raccolti anche per le certificazioni per le movimentazioni internazionali, se si considera che un arco di tempo considerevole potrebbe verificarsi tra la prova e lo spostamento con una possibile sieroconversione e conseguente rifiuto di introduzione. Un algoritmo di laboratorio è già stato proposto da Alanazi et al. (2014) per il rilevamento T. equi in campioni di sangue, in cui tre categorie (positivo, sospetti e negativi) sono identificati in base ai risultati della PCR. Un percorso di laboratorio efficiente dovrebbe anche prendere in considerazione gli aspetti pratici come costo (sostenuto dal laboratorio e da parte del medico / proprietario) e il tempo di risposta. Per queste ragioni gli autori propongono l'algoritmo mostrato nella Tabella 3, che si considera il più adatto al momento attuale, tenendo conto delle caratteristiche dei test. I liberi professionisti dovrebbero essere informati di raccogliere entrambi i campioni di sangue e di siero a prescindere dalla ragione (sospetto clinico o commercio internazionale), per cui si richiede analisi di laboratorio. I campioni di siero possono essere analizzati mediante IFAT e mediante cELISA per T. equi, contestualmente allo svolgimento delle rtPCRs su campione di sangue (tutti eseguiti come singola determinazione). In caso di negatività il campione è considerato "esente da infezione". Se il Ct è > 40 il campione deve essere ripetuto in due repliche; mentre quando il Ct è < 40 il soggetto è considerato ospitante un'infezione attiva se sierologicamente positivo o sospetto di avere una infezione precoce quando sierologicamente negativo. In entrambi i casi sono necessari ulteriori analisi, valutando i parametri emato-biochimici (anemia, funzionalità epatica e renale), per valutare lo stato del soggetto, in vista di un eventuale trattamento farmacologico. Inoltre i soggetti negativi sierologicamente dovrebbero essere campionati regolarmente ogni due settimane per rilevare la sieroconversione da IFAT o cELISA. Se non si verifica, altri test per verificare la specificità della PCR e la sensibilità del test sierologici potrebbero essere impiegati, come il sequenziamento o immunoblot. Questo metodo deve essere utilizzato solo come un terzo livello di diagnosi e deve essere migliorato e validato; infatti, a nostra conoscenza ci sono pochi studi che impiegano Immunoblot (Bose e Peymann, 1994; Böse e Hentrich 1994, Schelp et al, 1995). In caso contrario, se i campioni sono sieropositivi solo, una precedente infezione potrebbe essere ipotizzata, o anche una cronica, soprattutto se l'anamnesi è vaga o riporta e sintomi ricorrenti come la stanchezza o la riduzione delle prestazioni sportive. Questi soggetti, ovviamente, non possono essere movimentati e devono essere monitorati per la riattivazione in caso di stress o di malattie che possono compromettere il sistema immunitario. In conclusione la piroplasmosi equina è una malattia parassitaria importante sia per il commercio internazionale che per i liberi professionisti, essendo endemica in molti paesi del mondo. La diagnosi di laboratorio si basa sulla diagnosi diretta, sierologica e biomolecolare, con diverse caratteristiche diagnostiche che potrebbero influenzare l'interpretazione dei risultati. Questo è il primo studio di confronto che include saggi commerciali e della letteratura, condotti su 1300 campioni italiani, con l'obiettivo di verificare l'affidabilità dei risultati e asini un protocollo efficace di analisi. Quando impiegato in Italia, cELISA per B. caballi sembra essere inefficace, come la PCR commerciale per entrambi i parassiti. L'IFAT sia per piroplasmici e cELISA per T. equi sembra essere utile, come PCR letteratura per entrambi i parassiti, per valutare lo stato sanitario di un soggetto e indirizzare il libero professionista verso ulteriori analisi al fine di valutare un trattamento farmacologico.

Le ragioni di questa mancanza di sensibilità devono essere studiate analizzando le sequenze di geni e di aminoacidi, in quanto i dati potrebbero suggerire le divergenze tra i ceppi circolanti in tutto il mondo. Un miglioramento e la verifica di convalida cELISAs deve essere considerato dai produttori, e il loro utilizzo in paesi senza dati sieroepidemiologici dovrebbe essere condotto con attenzione. Alla situazione attuale, l'algoritmo e il percorso diagnostico proposto sembrano garantire le migliori prestazioni sensibilità ed efficacia nella diagnosi EP, anche se, il problema della mancanza di Gold Standard, devono essere risolti magari introducendo un ulteriore test di conferma come immunoblot.

Per quanto riguarda lo studio filogenetico anche in Italia sembrano essere presenti tre tipologie genetiche di piroplasmi, già riconosciute in precedenti lavori come Gruppo 1, 2 e 3.

Dato interessante è la correlazione, al momento solo statistica, tra gruppi filogenetici, sintomi e risultati di laboratorio. Il gruppo 1 sembra includere ceppi parassitari più patogeni, che causano però una risposta anticorpale assente, ridotta o non rilevata dai test in uso; mentre sono rilevati dalla PCR per EMA. Al contrario i ceppi degli altri due gruppi, sembrano essere correlati con uno stato asintomatico, rilevabile sierologicamente ma non con la PCR per EMA. Studi più approfonditi sono necessari per chiarire questi risultati.

### **WP3 “Studio caso/controllo per l’identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi”**

I risultati dell’analisi statistica hanno messo in evidenza come il sesso sia un fattore di rischio significativo, in quanto i maschi castrati e le femmine hanno una prevalenza maggiore dei maschi, questo dato può essere dovuto a differenze di gestione tra i vari sessi, con le femmine e i castrati forse tenuti più all’aperto o a rischio di venire in contatto con la zecca rispetto agli stalloni.

Essere stabulati in gruppo aumenta il rischio di contrarre i parassiti, forse per un aumentata probabilità di venire a contatto con la zecca e per diminuito grooming da parte del proprietario. Stesso discorso vale per la stabulazione esterna, che ovviamente è un fattore di rischio significativo. La classe di età >12 sembra avere un rischio maggiore, ma è da notare che solo un controllo appartiene a questa categoria contro i 7 casi confermati. Un numero maggiore di campioni sarebbe utile per approfondire il ruolo dell’età. Le variabili razza e attitudine sono associate tra loro: 64,74% dei cavalli da sella hanno attitudine equestre/ippico, quindi l'associazione diretta delle singole variabili con l'outcome potrebbe dipendere dall'una o dall'altra variabile che fa da confondente.

La vaccinazione sembra essere un fattore protettivo, in realtà potrebbe essere collegato alle pratiche generiche di gestione del soggetto, che potrebbe determinare una minore prevalenza. Un’ipotesi alternativa, totalmente da verificare, potrebbe essere una migliore stimolazione immunitaria dovuta ai vaccini che determina una risposta più pronta ed efficace contro i piroplasmi.

Le analisi ematobiochimiche che rilevano non sono tutte quelle analizzate ma solo una parte di esse (vedi Risultati WP3), questo potrà essere utile al libero professionista per verificare o meno la presenza di piroplasmi.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Abutarbush SM, Alqawasmeh DM, Mukbel RM, Al-Majali AM. Equine babesiosis: seroprevalence, risk factors and comparison of different diagnostic methods in Jordan. *Transbound Emerg Dis*. 2012 Feb;59(1):72-8.
- 2 Adaszek Ł, García-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Carbonero A, Arenas A, Winiarczyk S. Identification of piroplasms isolated from asymptomatic equine species from southern Spain. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2012 Nov-Dec;125(11-12):509-12.
- 3 Adaszek Ł, Górna M, Krzysiak M, Adaszek M, Garbal M, Winiarczyk S. Identification of the piroplasms isolated from horses with clinical piroplasmosis in Poland. *Wiad Parazytol*. 2011;57(1):21-6.
- 4 Alanazi AD, Alyousif MS, Hassieb MM. Seroprevalence study on *Theileria equi* and *Babesia caballi* antibodies in horses from central province of Saudi Arabia. *J Parasitol*. 2012 Oct;98(5):1015-7.
- 5 Awinda PO, Mealey RH, Williams LB, Conrad PA, Packham AE, Reif KE, Grause JF, Pelzel-McCluskey AM, Chung C, Bastos RG, Kappmeyer LS, Howe DK, Ness SL, Knowles DP, Ueti MW. Serum antibodies from a subset of horses positive for *Babesia caballi* by competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrate a protein recognition pattern that is not consistent with infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 Nov;20(11):1752-7.
- 6 Baldani CD, Hilario E, Nakaghi AC, Bertolini MC, Machado RZ. Production of recombinant EMA-1 protein and its application for the diagnosis of *Theileria equi* using an enzyme immunoassay in horses from São Paulo State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011 Jan-Mar;20(1):54-60.
- 7 Baptista C, Lopes MS, Tavares AC, Rojer H, Kappmeyer L, Mendonça D, da Câmara Machado A. Diagnosis of *Theileria equi* infections in horses in the Azores using cELISA and nested PCR. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013 Apr;4(3):242-5.
- 8 Beck R, Vojta L, Mrljak V, Marinculić A, Beck A, Zivicnjak T, Cacciò SM. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *Int J Parasitol*. 2009 Jun;39(7):843-8.
- 9 Bhoora R, Buss P, Guthrie AJ, Penzhorn BL, Collins NE. Genetic diversity of piroplasms in plains zebra (*Equus quagga burchellii*) and Cape mountain zebra (*Equus zebra zebra*) in South Africa. *Vet Parasitol*. 2010 Nov 24;174(1-2):145-9.
- 10 Bhoora R, Quan M, Franssen L, Butler CM, van der Kolk JH, Guthrie AJ, Zwegarth E, Jongejan F, Collins NE. Development and evaluation of real-time PCR assays for the quantitative detection of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses from South Africa. *Vet Parasitol*. 2010 Mar 25;168(3-4):201-11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.011>.
- 11 Bhoora R, Quan M, Matjila PT, Zwegarth E, Guthrie AJ, Collins NE. Sequence heterogeneity in the equi merozoite antigen gene (*ema-1*) of *Theileria equi* and development of an *ema-1*-specific TaqMan MGB assay for the detection of *T. equi*. *Vet Parasitol*. 2010 Aug 27;172(1-2):33-45.
- 12 Bhoora R, Franssen L, Oosthuizen MC, Guthrie AJ, Zwegarth E, Penzhorn BL, Jongejan F, Collins NE. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Vet Parasitol*. 2009 Feb 5;159(2):112-20.
- 13 Butler CM, Sloet van Oldruijtenborgh-Oosterbaan MM, Stout TA, van der Kolk JH, Wollenberg Lv, Nielen M, Jongejan F, Werners AH, Houwers DJ. Prevalence of the causative agents of equine piroplasmosis in the South West of The Netherlands and the

- identification of two autochthonous clinical *Theileria equi* infections. *Vet J.* 2012 Aug;193(2):381-5.
- 14 Cantú-Martínez MA, Segura-Correa JC, Silva-Páez ML, Avalos-Ramírez R, Wagner GG. Prevalence of antibodies to *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from northeastern Mexico. *J Parasitol.* 2012 Aug;98(4):869-70.
  - 15 Chhabra S, Ranjan R, Uppal SK, Singla LD. Transplacental transmission of *Babesia equi* (*Theileria equi*) from carrier mares to foals. *J Parasit Dis.* 2012 Apr;36(1):31-3. De Waal, D.T., 1992. Equine piroplasmiasis: a review. *Br. Vet. J.* 148, 6–14, [http://dx.doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90061-5](http://dx.doi.org/10.1016/0007-1935(92)90061-5).
  - 16 Donnellan, C.M.B., Marais H.J., 2009. Equine piroplasmiasis. In *Infectious Diseases of the Horse*, ed. Mair TS, Hutchinson RE. E V J; 333-40.
  - 17 Equine disease surveillance, July to September 2009. *Vet Rec.* 2009 Dec 26;165(25):736-9
  - 18 Farkas R, Tánczos B, Gyurkovszky M, Földvári G, Solymosi N, Edelhofer R, Hornok S. Serological and molecular detection of *Theileria equi* infection in horses in Hungary. *Vet Parasitol.* 2013 Feb 18;192(1-3):143-8.
  - 19 Friedhoff, K.T., Tenter, A.M., Müller, I., 1990. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 9 (4), 1187–1194.
  - 20 Fritz D. A PCR study of piroplasms in 166 dogs and 111 horses in France (March 2006 to March 2008). *Parasitol Res.* 2010 May;106(6):1339-42.
  - 21 García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Hernández, E., Adaszek, Ł., Carbonero, A., Almería, S., Jaén-Téllez, J.A., Gutiérrez-Palomino, P., Arenas, A., 2013. Seroprevalence and risk factors associated with *Babesia caballi* and *Theileria equi* infection in equids. *Vet. J.* 195, 172–178, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.012>.
  - 22 Georges KC, Ezeokoli CD, Sparagano O, Pargass I, Campbell M, D'Abadie R, Yabsley MJ. A case of transplacental transmission of *Theileria equi* in a foal in Trinidad. *Vet Parasitol.* 2011 Feb 10;175(3-4):363-6.
  - 23 Grandi G, Molinari G, Tittarelli M, Sasserà D, Kramer LH. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infection in horses from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Jul;11(7):955-6.
  - 24 Grause JF, Ueti MW, Nelson JT, Knowles DP, Kappmeyer LS, Bunn TO. Efficacy of imidocarb dipropionate in eliminating *Theileria equi* from experimentally infected horses. *Vet J.* 2013 Jun;196(3):541-6.
  - 25 Hall CM, Busch JD, Scoles GA, Palma-Cagle KA, Ueti MW, Kappmeyer LS, Wagner DM. Genetic characterization of *Theileria equi* infecting horses in North America: evidence for a limited source of U.S. introductions. *Parasit Vectors.* 2013 Feb 11;6:35.
  - 26 Jaffer O, Abdishakur F, Hakimuddin F, Riya A, Wernery U, Schuster RK. A comparative study of serological tests and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitol Res.* 2010 Feb;106(3):709-13.
  - 27 Kerber CE, Labruna MB, Ferreira F, De Waal DT, Knowles DP, Gennari SM. Prevalence of equine Piroplasmiasis and its association with tick infestation in the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2009 Oct-Dec;18(4):1-8.
  - 28 Kim, C.M., Blanco, L.B.C., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I., 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet. Parasitol.* 151, 158–163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.023>.
  - 29 Kouam MK, Masuoka PM, Kantzoura V, Theodoropoulos G. Geographic distribution modeling and spatial cluster analysis for equine piroplasms in Greece. *Infect Genet Evol.* 2010 Oct;10(7):1013-8.

- 30 Kouam, M.K., Kantzoura, V., Masuoka, P.M., Gajadhar, A. a., Theodoropoulos, G.,2010. Genetic diversity of equine piroplasms in Greece with a note on speciation within *Theileria* genotypes (*T. equi* and *T. equi*-like). *Infect. Genet. Evol.* 10, 963–968, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.06.008>.
- 31 Kumar S, Kumar R, Gupta AK, Yadav SC, Goyal SK, Khurana SK, Singh RK. Development of EMA-2 recombinant antigen based enzyme-linked immunosorbent assay for seroprevalence studies of *Theileria equi* infection in Indian equine population. *Vet Parasitol.* 2013 Nov 15;198(1-2):10-7.
- 32 Laus F, Veronesi F, Passamonti F, Paggi E, Cerquetella M, Hyatt D, Tesei B, Fioretti DP. Prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. *J Vet Med Sci.* 2013;75(6):715-20.
- 33 Marasca, R., Maffei, R., Morselli, M., Zucchini, P., Castelli, I., Martinelli, S., Torelli, G.,2005. Immunoglobulin mutational status detected through single-round amplification of partial V(H) region represents a good prognostic marker for clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia. *J. Mol. Diagn.* 7 (5),566–574, [http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60589-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60589-2).
- 34 Moretti A, Mangili V, Salvatori R, Maresca C, Scoccia E, Torina A, Moretta I, Gabrielli S, Tampieri MP, Pietrobelli M. Prevalence and diagnosis of *Babesia* and *Theileria* infections in horses in Italy: a preliminary study. *Vet J.* 2010 Jun;184(3):346-50.
- 35 Mujica FF, Perrone T, Forlano M, Coronado A, Meléndez RD, Barrios N, Alvarez R, Granda F. Serological prevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in horses of Lara State, Venezuela. *Vet Parasitol.* 2011 May 31;178(1-2):180-3.
- 36 Munkhjargal T, Sivakumar T, Battsetseg B, Nyamjargal T, Aboulaila M, Purevtseren B, Bayarsaikhan D, Byambaa B, Terkawi MA, Yokoyama N, Igarashi I. Prevalence and genetic diversity of equine piroplasms in Tov province, Mongolia. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:178-85.
- 37 Nagore, D., García-Sanmartín, J., García-Pérez, A.L., Juste, R.a., Hurtado, A., 2004.Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: Epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Vet. Parasitol.* 123, 41–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.04.010>.
- 38 Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S.V., Petney, T.N., 2013. The ecology of tick-borne diseases. *Int. J. Parasitol.* 43, 1059–1077, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.009>.
- 39 Pitel PH, Pronost S, Scrive T, Léon A, Richard E, Fortier G. Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. *Vet Parasitol.* 2010 May 28;170(1-2):182-4.
- 40 Qablan MA, Sloboda M, Jirků M, Oborník M, Dwairi S, Amr ZS, Hořín P, Lukeš J, Modrý D. Quest for the piroplasms in camels: identification of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in Jordanian dromedaries by PCR. *Vet Parasitol.* 2012 May25;186(3-4):456-60.
- 41 Rashid A, Mubarak A, Hussain A. Babesiosis in equines in Pakistan: a clinical report. *Vet Ital.* 2009 Jul-Sep;45(3):391-5.
- 42 Ribeiro AJ, Cardoso L, Maia JM, Coutinho T, Cotovio M. Prevalence of *Theileria equi*, *Babesia caballi*, and *Anaplasma phagocytophilum* in horses from the north of Portugal. *Parasitol Res.* 2013 Jul;112(7):2611-7.
- 43 Ribeiro IB, Câmara AC, Bittencourt MV, Marçola TG, Paludo GR, Soto-Blanco B. Detection of *Theileria equi* in spleen and blood of asymptomatic piroplasm carrier horses. *Acta Parasitol.* 2013 Jun;58(2):218-22.

- 44 Ros-García A, M'ghirbi Y, Hurtado A, Bouattour A. Prevalence and genetic diversity of piroplasm species in horses and ticks from Tunisia. *Infect Genet Evol.* 2013 Jul;17:33-7.
- 45 Rosales R, Rangel-Rivas A, Escalona A, Jordan LS, Gonzatti MI, Aso PM, Perrone T, Silva-Iturriza A, Mijares A. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Venezuelan horses using Competitive-Inhibition ELISA and PCR. *Vet Parasitol.* 2013 Sep 1;196(1-2):37-43.
- 46 Rüegg, S.R., Torgerson, P., Deplazes, P., Mathis, A., 2007. Age-dependent dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in southwest Mongolia based on IFAT and/or PCR prevalence data from domestic horses and ticks. *Parasitology* 134, 939–947, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182007002405>.
- 47 Rüegg, S.R., Heinzmann, D., Barbour, A.D., Torgerson, P.R., 2008. Estimation of the transmission dynamics of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses. *Parasitology* 135 (5), 555–565, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182008004204>.
- 48 Salama AA, Aboulaila M, Moussa AA, Nayel MA, El-Sify A, Terkawi MA, Hassan HY, Yokoyama N, Igarashi I. Evaluation of in vitro and in vivo inhibitory effects of fusidic acid on *Babesia* and *Theileria* parasites. *Vet Parasitol.* 2013 Jan 16;191(1-2):1-10.
- 49 Salim B, Bakheit MA, Kamau J, Sugimoto C. Current status of equine piroplasmosis in the Sudan. *Infect Genet Evol.* 2013 Jun;16:191-9.
- 50 Salim B, Bakheit MA, Kamau J, Nakamura I, Sugimoto C. Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan. *Parasitol Res.* 2010 Jan;106(2):493-8.
- 51 Salvagni CA, Dagnone AS, Gomes TS, Mota JS, Andrade GM, Baldani CD, Machado RZ. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010 Jul-Sep;19(3):135-40.
- 52 Scoles, G., Ueti, M.W., 2015. Vector ecology of equine piroplasmosis. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 561–580, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-021110>.
- 53 Schwarz, A., Maier, W.a., Kistemann, T., Kampen, H., 2009. Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 212, 87–96, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.12.001>.
- 54 Seo MG, Yun SH, Choi SK, Cho GJ, Park YS, Cho KH, Kwon OD, Kwak D. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. *Res Vet Sci.* 2013 Jun;94(3):579-83.
- 55 Seo MG, Yun SH, Choi SK, Cho GJ, Park YS, Kwon OD, Cho KH, Kim TH, Jeong KS, Park SJ, Kwon YS, Kwak D. Seroprevalence of equine piroplasms in the Republic of Korea. *Vet Parasitol.* 2011 Jun 30;179(1-3):224-6.
- 56 Sevinc, F., Maden, M., Kumars, C., Sevinc, M., Ekici, O.D., 2008. A comparative study on the prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horse sub-populations in Turkey. *Vet. Parasitol.* 156, 173–177, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.006>.
- 57 Shkap, V., Cohen, I., Leibovitz, B., Savitsky, Pipano, E., Avni, G., Shofer, S., Giger, U., Kappmeyer, L., Knowles, D., 1998. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive inhibition ELISA and IFA assays. *Vet. Parasitol.* 76, 251–259.
- 58 Short MA, Clark CK, Harvey JW, Wenzlow N, Hawkins IK, Allred DR, Knowles DP, Corn JL, Grause JF, Hennager SG, Kitchen DL, Traub-Dargatz JL. Outbreak of equine piroplasmosis in Florida. *J Am Vet Med Assoc.* 2012 Mar 1;240(5):588-95.

- 59 Sigg L, Gerber V, Gottstein B, Doherr MG, Frey CF. Seroprevalence of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in the Swiss horse population. *Parasitol Int.* 2010 Sep;59(3):313-7.
- 60 Sloboda M, Jirků M, Lukešová D, Qablan M, Batsukh Z, Fiala I, Hořin P, Modrý D, Lukeš J. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. *Vet Parasitol.* 2011 Jun 30;179(1-3):246-9.
- 61 Steinman, A., Zimmerman, T., Klement, E., Lensky, I.M., Berlin, D., Gottlieb, Y., Baneth, G., 2012. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. *Vet. Parasitol.* 187, 558–562, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.018>.
- 62 Sumbria, D., Das Singla, L., Veterinary, D., Scien, A., Das, L., Guru, S., Dev, A., Scien, A., 2015. Recent Diagnostic and control approaches in Equine piroplasmiasis. *Veterinaria* 02/2015; 2(1):1-6.
- 63 Thrusfield, M., 2007. *Veterinary Epidemiology*, 3rd Edition. Wiley-Blackwell, USA.
- 64 Vanwambeke, S.O., Sumilo, D., Bormane, A., Lambin, E.F., Randolph, S.E., 2010. Landscape predictors of tick-borne encephalitis in Latvia: land cover, land use, and land ownership. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 497–506, <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2009.0116>.
- 65 Vieira TS, Vieira RF, Finger MA, Nascimento DA, Sicupira PM, Dutra LH, Deconto I, Barros-Filho IR, Dornbusch PT, Biondo AW, Vidotto O. Seroepidemiological survey of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in horses from a rural and from urban areas of Paraná State, southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013 Dec;4(6):537-41.
- 66 Vranova, M., Alloggio, I., Qablan, M., Vyskocil, M., Baumeisterova, A., Sloboda, M., Putnova, L., Vrtkova, I., Modry, D., Horin, P., 2011. Genetic diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European Asiatic and African domestic donkeys. *Infect. Genet. Evo* 2011 Jul;11(5):1136-41. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.010.

## **RACCOMANDAZIONI**

### **Elementi gestionali e/o diagnostici:**

- I liberi professionisti dovrebbero sempre effettuare un prelievo di sangue con e senza EDTA, a prescindere dal motivo (movimentazione internazionale, diagnosi di forme cliniche)
- Nei casi di sospetto clinico di piroplasmosi le analisi da chiedere dovrebbero essere: bilirubina totale e diretta, emocromo, e protidogramma, esami sierologici e PCR per T. equi e B. caballi. Per la prima si consiglia IFI e ELISA, mentre per la B. caballi solo l'IFI.
- Nel caso in cui vi siano positività in PCR e negatività sierologiche si consiglia di non movimentare i soggetti e ripetere i prelievi sierologici dopo un periodo di 2 settimane.
- Prima di effettuare un trattamento farmacologico su un animale sintomatico e sierologicamente positivo si dovrebbero attendere tutti i risultati, ed eventualmente chiedere approfondimenti, quali funzionalità epatica e renale.

### **Indicazioni per la ricerca**

- Approfondire la distribuzione e lo studio dei fattori favorevoli allo sviluppo e la persistenza delle specie vettori di Piroplasmosi
- Approfondire la distribuzione dei diversi ceppi di Piroplasma e la loro correlazione con la sintomatologia, i risultati biomolecolari e la carica parassitaria nel sangue.
- Specifici suggerimenti per eventuali provvedimenti normativi da adottare. La certificazione per le movimentazioni internazionali verso l'Italia dovrebbe comprendere sempre la negatività sia sierologica che con test biomolecolari effettuati non più di 15 giorni prima della partenza.

## MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI

I risultati sono stati/verranno divulgati nelle seguenti modalità:

1. Articoli scientifici su riviste con Impact Factor. Oltre all'articolo già pubblicato in allegato sono in stesura articoli su filogenesi, confronto metodi sierologici e biomolecolari e prevalenza dei piroplasmi nella popolazione asinina. **Fruitori: comunità scientifica**
2. Partecipazione a Congressi Nazionali ed Internazionali.

- a) Bartolomé Del Pino L.E., Cersini A., Scicluna M.T., Nardini R., Manna G., Antognetti V., Autorino G.L. Evaluation of PCR methods for the molecular detection of babesia caballi and theileria equi on field samples. 3RD EAVLD Congress, 12-15/10/2014, Pisa, Italy
- b) Cersini Antonella, Scicluna Maria Teresa, Bartolomé del Pino Leticia Elisa, Nardini Roberto, Conti Raffaella, Manna Giuseppe, Autorino Gian Luca "Preliminary observations on the genetic heterogeneity of piroplasms in the horse population of central Italy" XVII International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD). June 15-18, 2015, Saskatoon Canada.
- c) Scicluna Maria Teresa, Nardini Roberto, Bartolomé del Pino Leticia Elisa, Ricci Ida, Rosone Francesca, Autorino Gian Luca Addition of PCR methods to the conventional serology for the routine diagnosis of equine piroplasmosis. XVII International Symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (WAVLD). June 15-18, 2015, Saskatoon Canada.
- d) M.T. Scicluna, R. Nardini, L.E. Bartolome, Cersini, G. Manna, G.L. Autorino Preliminary results on the inclusion of PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis (EP) 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine Veterinary Science 39 (2016) S7eS19
- e) M.T. Scicluna, R. Nardini, R. Frontoso, I. Ricci, C.J. Issel, G.L. Autorino Evaluation of the diagnostic performance of equine infectious anaemia (EIA) serological ELISAs as screening tools in control programmes 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine Veterinary Science 39 (2016) S7eS19
- f) A. Cersini, LE Bartolome Del Pino, V. Antognetti, R. Lorenzetti, R. Nardini, G.L. Autorino, M.T. Scicluna. Preliminary investigations on the sequence heterogeneity of the 18S rRNA gene of Theileria equi and Babesia caballi strains collected from a horse population in Central Italy 10th IEIDC Abstracts / Journal of Equine Veterinary Science 39 (2016) S7eS19

**Fruitori: comunità scientifica**

3. Giornate di aggiornamento.

- a) Progetto IZSLT 16/11 "Stima delle prevalenze delle infezioni da *B. caballi*, *T. equi* ed *A. 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" Incontro di presentazione ed invito alla collaborazione Roma – 15/4/2013 Sede dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri".
- b) 12/12/13 Relazione di aggiornamento. Sede dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri".
- c) 3/3/14 Relazione di aggiornamento. Sede dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri".
- d) Da effettuare presentazione dei risultati della ricerca successivamente alla rendicontazione del progetto nell'ambito della giornata "L'attività di ricerca corrente in Istituto. Divulgazione dei principali risultati ed ambiti di applicazione: edizione 2017"

**Fruitori: liberi professionisti**

## ALLEGATO 1:TABELLE

Tabella 1: Composizione delle soluzioni mix per la REAL TIME PCR Babesia caballi (Bhoora R. et al., 2010)

Reagente	Volume per 1 campione ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	5,37	
TaqMan 2X PCR Master Mix	12,5	(1X)
Primer BC18SF402 (30 $\mu$ M)	1	0,9 $\mu$ M
Primer BC18SR496 (30 $\mu$ M)	1	0,9 $\mu$ M
Probe BC-18SP (10mM)	0,25	0,25 mM
Stampo a DNA	5	
Volume totale	25	

Tabella 2: Ciclo termico delle due reazioni della REAL TIME PCR Babesia caballi (Bhoora R. et al., 2010)

Temperatura (C°)	Tempo
95	10'
50 Cicli	95 20''
	60 1'

Tabella 3: Composizione delle miscele di ligasi utilizzate nel clonaggio della regione 18S di Babesia caballi

Reagente	Quantità ( $\mu$ l)		
	Miscela 1	Miscela 2	Miscela 3
Prodotto PCR	1	2	3
Soluzione sali	1	1	1
Topo vector	1	1	1
Acqua	3	2	1
Totale	6	6	6

Tabella 4 : Composizione della mix per la PCR effettuata coi primer RLB1 della regione ipervariabile V4 I8s

Reagente	Volume per 1 campione ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	15,61	
Buffer (10X)	2,5	(1x)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75	15 mM
dNTP(10 mM)	0,5	0,2 mM
Primer RLB F1 (30 $\mu$ M)	0,17	0,2 $\mu$ M
Primer RLB R1 (30 $\mu$ M)	0,17	0,2 $\mu$ M
Taq Polimerasi (5U/ $\mu$ l)	0,3	0,06 U/ $\mu$ l
Stampo a DNA	5	
Volume totale	25	

Tabella 5: Ciclo termico per la PCR effettuata coi primer RLB1 della regione ipervariabile V4 I8s

Temperatura (C°)	Tempo
94	5'
40 Cicli	94    35''
	51    35''
	72    35''
72	10'

Tabella 6: Composizione della mix per la PCR effettuata coi primer RLB2 della regione ipervariabile V4 I8s

Reagente	Volume per 1 campione ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	14,09	
Buffer (10X)	2,5	(1x)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75	15 mM
dNTP(10 mM)	0,5	0,2 mM
Primer RLB F2 (30 $\mu$ M)	0,83	1 $\mu$ M
Primer RLB R2 (30 $\mu$ M)	0,83	1 $\mu$ M
Taq Polimerasi (5U/ $\mu$ l)	0,5	0,10 U/ $\mu$ l
Stampo a DNA	5	
Volume totale	25	

Tabella 7: Ciclo termico per la PCR effettuata coi primer RLB2 della regione ipervariabile V4 18s

Temperatura (C°)		Tempo
94		5'
40 Cicli	94	1'
	50	1'
	72	90''
72		10'

Tabella 8: Composizione delle miscele di ligasi testate

Reagente	Quantità (µl)	
	Miscela 1	Miscela 2
Prodotto PCR	1	2
Soluzione sali	1	1
Topo vector	1	1
Acqua	3	2
Totale	6	6

Tabella 9: Composizione delle soluzioni mix per la REAL TIME PCR *Theileria equi* (Kim C., 2008)

Reagente	Volume per 1 campione (µl)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	6,12	
TaqMan 2X PCR Master Mix	12,5	(1X)
Primer Be18SF (30 µM)	0,375	0,45 µM
Primer Be18SR (30 µM)	0,375	0,45 µM
Probe Be18SP (10mM)	0,63	0,25 mM
Stampo a DNA	5	
Volume totale	25	

Tabella 10: Ciclo termico delle due reazioni della REAL TIME PCR *Theileria equi* (Kim C., 2008)

Temperatura (C°)		Tempo
95		10'
45 Cicli	95	20''
	55	1'

Tabella 11: Composizione della mix per la Nested-PCR per la regione ipervariabile V4 di *Theileria equi*

Reagente	Volume per 1 campione (µl)		Concentrazione finale
	Prima reazione	Seconda reazione	
H <sub>2</sub> O DEPC	15,61	14,09	
Buffer (10X)	2,5	2,5	(1X)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75	0,75	15 mM
dNTP(10 mM)	0,5	0,5	0,2 mM
Primer RLB F1 (30 µM)	0,17		0,2 µM
Primer RLB R1 (30 µM)	0,17		0,2 µM
Taq Polimerasi (5U/µl)	0,3		0,06 U/µl
Primer RLB F2 (30 µM)		0,83	1 µM
Primer RLB R2 (30 µM)		0,83	1 µM
Taq Polimerasi (5U/µl)		0,5	0,10 U/µl
Stampo a DNA	5	5	
Volume totale	25	25	

Tabella 12: Criteri di classificazione di caso generico (a) e specifico (b) dello studio caso-controllo

a)

PCR	STRISCIO	SIEROLOGICO	SINTOMI	CASO GENERICO
+	+	+	+	CASO
+	-	-	+	CASO
+	-	+	+	CASO
-	+	+	+	CASO
-	+	-	+	CASO
-	-	+	+	NON CASO
-	-	-	+	NON CASO

b)

DESCRIZIONE	CLASSIFICAZIONE CASO SPECIFICO
NO PCR O STRISCIO POSITIVO	NON CASO
CASO T EQUI	PCR POS PER T EQUI + SINTOMI
CASO B CABALLI	PCR POS PER B CABALLI + SINTOMI
CASO MISTO	PCR POS PER ENTRAMBI + SINTOMI
CASO PIROPLASMA	STRISCIO POSITIVO + SINTOMI
CASO NON CLASSIFICATO	STRISCIO NON ESEGUITO+ SINTOMI + PCR NEGATIVA

Tabella 13 Risultati dell'analisi univariata per la sieroprevalenza di *T. equi* e *B. caballi*. Un  $p$  value  $\leq 0.05$  è stato considerato significativo.  $N$ = numero di campioni testati; 95% CI= intervallo di confidenza al 95%;  $p$ =  $p$  value

Variabile	Categoria	N	<i>T. equi</i>			<i>B. caballi</i>		
			Prevalenza (%)	95% CI	p	Prevalenza(%)	95% CI	p
Sesso								
	Maschi	344	29.9	(25.3-35.0)	<0.001	2.9	(1.6-5.3)	<0.001
	Femmine	329	50.2	(44.8-55.5)		15.2	(11.7-19.5)	
Età (anni)								
	≤6	214	31.8	(25.9-38.3)	<0.01	10.7	(7.3-15.6)	0.08
	7-12	237	43.9	(37.7-50.2)		11.0	(7.6-15.6)	
	>12	204	44.6	(37.9-51.5)		5.4	(3.0-9.4)	
Razza								
	Straniera	203	30.5	(24.6-37.2)	<0.01	2.5	(1.1-5.6)	<0.001
	Italiana	260	41.5	(35.7-47.6)		9.6	(6.6-13.8)	
	Mista	210	46.7	(40.0-53.4)		14.3	(10.2-19.7)	
Accesso al pascolo								
	No	192	31.3	(25.1-38.1)	<0.01	1.6	(0.5-4.5)	<0.001
	Si	481	43.2	(38.9-47.7)		11.9	(9.3-15.0)	
Altitudine (m)								
	<150	328	34.1	(29.2-39.4)	<0.01	1.2	(0.5-3.1)	<0.001
	150-600	275	47.3	(41.5-53.2)		20.0	(15.7-25.1)	
	>600	70	37.1	(26.8-48.9)		1.4	(0.3-7.7)	
Copertura del suolo								
	>75% foresta	65	44.6	(33.2-56.7)	<0.01	3.1	(0.8-10.5)	<0.001
	50-75% colture	184	40.2	(33.4-47.4)		8.7	(5.4-13.7)	
	50-75% foresta	116	26.7	(19.5-35.4)		0.9	(0.2-4.7)	
	Misto	308	43.5	(38.1-49.1)		13.3	(10.0-17.6)	
Zona climatica								
	Umida	393	37.2	(32.5-42.0)	0.114	3.3	(1.9-5.6)	<0.001
	Sub-Umida	260	42.3	(36.5-48.4)		17.7	(13.5-22.8)	
	Umido-semiarido	20	60.0	(38.7-78.1)		5.0	(0.9-23.6)	
Tipo suolo								
	Eutric Cambisol	134	44.0	(35.9-52.5)	<0.001	2.2	(0.8-6.4)	<0.001
	Dystric cambisol	216	31.5	(25.7-38.0)		1.4	(0.5-4)	
	Andosol	177	25.4	(19.6-32.3)		0	(0-2.1)	
	Xerosol	146	65.8	(57.7-73.0)		37.0	(29.6-45.1)	
Tipo provincia								
	Costiera	332	31.3	(26.6-36.5)	<0.001	4.2	(2.5-7.0)	<0.05
	Interna	341	48.1	(42.8-53.4)		13.5	(10.3-17.5)	

Tabella 14 Risultati dell'analisi multivariata per la seroprevalenza di Tequi. Un  $p$  value  $\leq 0.05$  è stato considerato significativo.  $N$ = numero di campioni testati; 95% CI= intervallo di confidenza al 95%;  $p$ =  $p$  value;  $a$  = baseline.

Variabile	Categoria	p	Odds ratio	95% CI
Sesso	Maschi	a		
	Femmine	0.001	1.86	(1.27-2.71)
Età (anni)	$\leq 6$	a		
	7-12	0.002	2.09	(1.32-3.31)
	>12	0.000	2.59	(1.61-4.16)
Razza	Straniera	a		
	Italiana	0.000	3.57	(1.99-6.41)
	Mista	0.002	2.51	(1.38-4.55)
Accesso al pascolo	No	a		
	Si	0.004	2.22	(1.29-3.83)
Copertura del suolo	>75% foresta	a		
	50-75% colture	0.170	0.56	(0.25-1.27)
	50-75% foresta	0.020	0.42	(0.20-0.87)
	Misto	0.564	0.76	(0.29-1.95)
Tipo suolo	Eutric Cambisol	a		
	Dystric cambisol	0.001	0.29	(0.14-0.60)
	Andosol	0.084	0.49	(0.21-1.10)
	Xerosol	0.002	3.16	(1.54-6.47)
Tipo provincia	Costiera	a		
	Interna	0.005	2.5	(1.33-4.74)

Tabella 15 Risultati dell'analisi univariata per la prevalenza in PCR di *T. equi* e *B. caballi*. Un  $p$  value  $\leq 0.05$  è stato considerato significativo. N= numero di campioni testati; 95% CI= intervallo di confidenza al 95%;  $p$ =  $p$  value

Variabile	Categoria	N	<i>T. equi</i>			<i>B. caballi</i>		
			Prevalenza (%)	95% CI	p	Prevalenza(%)	95% CI	p
Sesso								
	Maschi	100	61.0	(51.2-70.0)	<0.01	8.0	(4.1-15.0)	0.34
	Femmine	163	76.1	(69.0-82.0)		11.7	(7.6-17.5)	
Età (anni)								
	≤6	67	83.6	(72.9-90.6)	<0.001	14.9	(8.3-25.3)	<0.05
	7-12	104	74.0	(64.9-81.5)		13.5	(8.2-21.3)	
	>12	81	61.7	(50.8-71.6)		3.4	(1.2-9.7)	
Razza								
	Straniera	61	57.4	(44.9-69.0)	<0.01	11.5	(5.7-21.8)	0.90
	Italiana	104	69.2	(59.8-77.3)		10.6	(6.0-18.0)	
	Mista	98	79.6	(70.6-86.4)		9.2	(4.9-16.5)	
Accesso al pascolo								
	No	57	57.9	(41.1-73.0)	<0.05	5.3	(1.8-14.4)	0.22
	Si	206	73.8	(65.2-80.8)		11.7	(8.0-16.7)	
Altitudine (m)								
	<150	107	62.6	(53.2-71.2)	<0.05	5.6	(2.6-11.7)	0.07
	150-600	129	72.9	(64.6-79.8)		14.7	(9.6-21.9)	
	>600	27	88.9	(71.9-96.1)		7.4	(2.1-23.4)	
Copertura del suolo								
	>75% foresta	30	86.7	(70.3-94.7)	<0.05	10.0	(3.5-25.6)	0.60
	50-75% colture	74	78.4	(67.7-86.2)		10.8	(5.6-19.9)	
	50-75% foresta	32	59.4	(42.3-74.5)		3.1	(0.6-15.7)	
	Misto	127	64.6	(55.9-72.3)		11.8	(7.3-18.6)	
Zona climatica								
	Umida	141	60.3	(52.0-68.0)	<0.001	5.7	(2.9-10.8)	<0.05
	Sub-Umida	109	81.7	(73.4-87.8)		16.5	(10.7-24.6)	
	Umido-semiarido	13	84.6	(57.8-95.7)		7.7	(1.4-33.3)	
Tipo suolo								
	Eutric Cambisol	59	64.4	(51.7-75.4)	<0.001	13.6	(7.0-24.5)	<0.05
	Dystric cambisol	70	77.1	(66.0-85.4)		4.3	(1.5-11.9)	
	Andosol	44	43.2	(29.7-57.8)		2.3	(0.4-11.8)	
	Xerosol	90	82.2	(73.1-88.8)		16.7	(10.4-25.7)	
Tipo provincia								
	Costiera	102	55.9	(46.2-65.1)	<0.001	4.9	(2.1-11.0)	<0.05
	Interna	161	79.5	(72.6-85.0)		13.7	(9.2-19.8)	

Table 16: Risultati dell'analisi multivariata per la positività in PCR per *T. equi* and *B. caballi*. Un  $p$  value  $\leq 0.05$  è stato considerato significativo.  $N$ = numero di campioni testati; 95% CI= intervallo di confidenza al 95%;  $p$ =  $p$  value;  $a$  = baseline.

<i>T. equi</i>				
Variables	Category	p	Odds Ratio	95% CI
Age (years)				
	$\leq 6$	a		
	7-12	0.110	0.51	(0.22-1.16)
	>12	0.004	0.29	(0.12-0.66)
Soil				
	Eutric Cambisol	a		
	Dystrict Cambisol	0.04	3.59	(1.49-8.66)
	Andosol	0.354	1.71	(0.55-5.29)
	Xerosol	0.001	4.55	(1.87-1.08)
Province location				
	Coastal	a		
	Inland	0.007	2.91	(1.33-6.35)
<i>B. caballi</i>				
Variables	Category	p	Odds Ratio	95% CI
Climatic zone				
	Humid	a		
	Sub-Humid	0.009	3.55	(1.38-9.16)
	Moist-semiarid	0.185	5.83	(0.43-9.17)
Soil				
	Eutric Cambisol	a		
	Dystrict Cambisol	0.020	0.14	(0.03-0.74)
	Andosol	0.091	0.16	(0.02-1.34)
	Xerosol	0.749	0.85	(0.31-2.30)

Tabella 17: Composizione della soluzione mix per la PCR PCR RAP1 gene *Babesia caballi* (Bhoora R. et al., 2010)

Reagente	Volume per 1 campione ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	33,84	
Buffer (10X)	5	(1X)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3	1,5 mM
dNTP(10 mM)	1	0,2 mM
Primer BC-RAP2F (30 $\mu$ M)	0,83	0,5 $\mu$ M
Primer BC-RAP2R (30 $\mu$ M)	0,83	0,5 $\mu$ M
Ampli TaqGold (5U/ $\mu$ l)	0,5	0,05 U/ $\mu$ l
Stampo a DNA	5	
Volume totale	50	

Tabella 18: Ciclo termico della PCR RAPI gene *Babesia caballi* (Bhoora R. et al., 2010)

Temperatura (C°)		Tempo
95		10'
45 Cicli	95	1'
	58	1'
	72	1'
72		7'

Tabella 19: Composizione della soluzione mix per la PCR *Babesia caballi* (Battsetseg B.,2002)

Reagente	Volume per 1 campione (µl)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	32	
Buffer (10X)	5	(1X)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	4	2 mM
BSA	2,5	50 µg/ml
dNTP(10 mM)	1,25	0,25 mM
Primer BcaF (30 µM)	1	0,6 µM
Primer BcaR (30 µM)	1	0,6 µM
Ampli TaqGold (5U/µl)	0,25	0,025 U/ µl
Stampo a DNA	3	
Volume totale	50	

Tabella 20: Ciclo termico della PCR *Babesia caballi* (Battsetseg B.,2002)

Temperatura (C°)		Tempo
94		10'
35 Cicli	94	1'
	57	1'
	72	1'
72		7'

Tabella 21: Composizione delle soluzioni mix per le due reazioni della Nested PCR specifica per *Babesia caballi* (Battsetseg B., et al. 2002)

Reagente	Volume per 1 campione ( $\mu$ l)		Concentrazione finale
	Prima reazione	Seconda reazione	
H <sub>2</sub> O DEPC	35,59	36,59	
Buffer (10X)	5	5	(1X)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3	3	15 mM
dNTP(10 mM)	1,25	1,25	0,25 mM
Primer BC48 F1 (30 $\mu$ M)	0,83		0,5 $\mu$ M
Primer BC48 R3 (30 $\mu$ M)	0,83		0,5 $\mu$ M
Primer BC48 F11 (30 $\mu$ M)		0,83	0,5 $\mu$ M
Primer BC48 R31 (30 $\mu$ M)		0,83	0,5 $\mu$ M
Ampli TaqGold (5U/ $\mu$ l)	0,5	0,5	0,05 U/ $\mu$ l
Stampo a DNA	3	2	
Volume totale	50	50	

Tabella 22: Ciclo termico delle due reazioni della Nested PCR specifica per *Babesia caballi* (Battsetseg B., et al. 2002)

Temperatura (C°)	Tempo	
94	10'	
40 Cicli	94	1'
	60	2'
	72	1'
72	7'	

Tabella 23: Composizione delle soluzioni mix per la PCR END POINT per *Theileria equi* (Battsetseg B. et al., 2002)

Reagente	Volume per 1 campione ( $\mu$ l)	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O DEPC	31,6	
Buffer (10X)	5	(1X)
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3	1,5 mM
BSA	2,5	50 $\mu$ g/ml
dNTP(10 mM)	1,25	0,25 mM
Primer BcaF (30 $\mu$ M)	0,7	0,4 $\mu$ M
Primer BcaR (30 $\mu$ M)	0,7	0,4 $\mu$ M
Ampli TaqGold (5U/ $\mu$ l)	0,25	0,025 U/ $\mu$ l
Stampo a DNA	5	
Volume totale	50	

Tabella 24: Ciclo termico delle due reazioni della PCR END POINT per *Theileria equi* (Battsetseg B. et al., 2002)

Temperatura (C°)		Tempo
94		10'
35Cicli	94	1'
	60	1'
	72	1'
72		10'

Tabella 25: Numero di positivi rilevati dai diversi protocolli sul totale dei 103 campioni analizzati per il confronto

Totale campioni	T1/B1	T2/B2	T3/B3	T4/B4
103	29/4	29/8	35/4	27/2

Tabella 26: Numero di PCR per *B. caballi* e *T. equi* con risultato concorde sui 103 campioni utilizzati per il confronto iniziale

	Numero di PCR in accordo					
	Babesia caballi			Theileria equi		
	4	3	2	4	3	2
Positivo	1	0	5	26	1	4
Negativo	93	4		67	5	

Tabella 27: Valori di sensibilità relativa (rSe) e specificità relativa (rSp) dei protocolli n° 1,2, 4 rispetto ai protocolli n° 3, che hanno rilevato il maggior numero di positivi per entrambi i parassiti

	rSe	rSp		rSe	rSp
	T3			B3	
T1	80	98,53	B1	25	96,97
T2	82,86	100	B2	50	93,94
T4	77,14	100	B4	50	100

Tabella 28: Percentuali di positivi rilevati da ogni ciascun test all'interno dell'intero campione (generale), dei casi sospetti e del gruppo degli asintomatici. La stessa lettera apice (per *B. caballi*) o un numero (per *T. equi*) indica, all'interno della stessa colonna, la differenza statistica tra i test ( $p < 0.05$ ). Le proporzioni di positivi sono state calcolate sul numero totale di campioni analizzati con ciascuna tecnica, mentre l'analisi statistica è stata effettuata per ogni coppia di test su campioni con risultati per entrambe le tecniche.

Test	Babesia caballi			Theileria equi		
	Totale	Asintomatici	Sintomatici	Totale	Asintomatici	Sintomatici
IFAT	0,13 <sup>a</sup>	0,19 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,42 <sup>1</sup>	0,5	0,32 <sup>1</sup>
ELISA	0,05 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,03 <sup>ab</sup>	0,38 <sup>2</sup>	0,4 <sup>1</sup>	0,32 <sup>2</sup>
PCR Genesisig ®	0,02 <sup>cd</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,06 <sup>c</sup>	0,30 <sup>34</sup>	0,34 <sup>23</sup>	0,23 <sup>3</sup>
PCR della letteratura	0,07 <sup>ce</sup>	0,08 <sup>b</sup>	0,04 <sup>d</sup>	0,58 <sup>35</sup>	0,64 <sup>2</sup>	0,34 <sup>4</sup>
Striscio ematico	0,07 <sup>bde</sup>	0,01	0,10 <sup>bcd</sup>	0,07 <sup>1245</sup>	0,01 <sup>13</sup>	0,1 <sup>1234</sup>

Tabella 29: Valori di concordanza totale e concordanza su campioni positivi (tra parentesi) tra ogni coppia di test per l'intero campione di popolazione (totale), per i casi sospetti e per gli asintomatici. La metà inferiore si riferisce a *B. caballi*, quella superiore a *T. equi*.

		IFAT	ELISA	PCR Genesig®	PCR della letteratura	Striscio ematico		
Babesia caballi	IFAT		0,79 (0,59)	0,80 (0,55)	0,82 (0,70)	0,84 (0,36)	Totale	Theileria equi
	ELISA	0,86 (0,00)		0,68 (0,44)	0,71 (0,63)	0,72 (0,11)		
	PCR Genesig®	0,87 (0,11)	0,90 (0,04)		0,75 (0,58)	0,72 (0,11)		
	PCR della letteratura	0,82 (0,14)	0,86 (0,14)	0,94 (0,24)		0,82 (0,48)		
	Striscio ematico	0,90 (0,29)	0,91 (0,03)	0,93 (0,14)	0,81 (0,10)			
	IFAT		0,84 (0,73)	0,74 (0,51)	0,80 (0,72)	1,00 (0,00)	Asintomatici	
	ELISA	0,84 (0,00)		0,62 (0,45)	0,69 (0,65)	0,81 (0,04)		
	PCR Genesig®	0,86 (0,14)	0,88 (0,03)		0,71 (0,56)	0,89 (0,06)		
	PCR della letteratura	0,82 (0,16)	0,83 (0,14)	0,93 (0,22)		/		
	Striscio ematico	0,98 (0,00)	0,97 (0,00)	0,98 (0,00)	/			
	IFAT		0,71 (0,34)	0,87 (0,62)	0,85 (0,67)	0,80 (0,36)	Sintomatici	
	ELISA	0,91 (0,00)		0,78 (0,43)	0,78 (0,44)	0,68 (0,13)		
	PCR Genesig®	0,90 (0,05)	0,95 (0,12)		0,91 (0,72)	0,83 (0,30)		
	PCR della letteratura	0,89 (0,08)	0,96 (0,00)	0,98 (0,50)		0,82 (0,48)		
	Striscio ematico	0,88 (0,26)	0,88 (0,03)	0,90 (0,15)	0,81 (0,10)			

Tabella 30: Algoritmo diagnostico proposto per la valutazione dello stato sanitario per piroplasmosi equina.

		PCR <sup>a</sup>		
		POSITIVO (Ct < 40)	NEGATIVO	INCONCLUSIVO (Ct ≥ 40)
TEST SIEROLOGICI <sup>b</sup>	POSITIVO	<b>INFEZIONE ATTIVA:</b> evalutare parametri clinici ed ematologici in funzione di un possibile trattamento. <b>INFEZIONE PASSATA O CRONICA:</b> ripetere PCR con il doppio del template	<b>INFEZIONE PASSATA O CRONICA:</b> ripetere PCR con il doppio del template	<b>INFEZIONE PASSATA O CRONICA:</b> ripetere PCR con il doppio del template
	NEGATIVO	<b>INFEZIONE RECENTE:</b> monitorare per seroconversione; valutare parametri clinici ed ematologici in funzione di un possibile trattamento.	<b>NON INFETTO</b>	<b>SOSPETTO:</b> ripetere PCR con il doppio del template

Tabella 31: Risultati dell'analisi filogenetica per *B. caballi* e *T. equi* stratificati per presenza di sintomi, risultati sierologici, risultati PCR EMA e presenza di coinfezione.

Variabile	Categoria	Gruppo Babesia caballi				Gruppo Theileria equi			
		1	2	3	p	1	2	3	p
Presenza di sintomi	Asintomatici	3	2	1	0,999	11	36	13	<0,0001
N=94	Sintomatici	2	0	1		30	2	2	
Risultato ELISA	Negativo	4	0	2	0,167	24	5	3	<0,0001
N=94	Positivo	1	2	0		16	33	11	
PCR EMA	Debole/Negativo	/	/	/	/	10	23	9	0,006
N=91	Positivo	/	/	/		28	15	6	
Coinfezione	No	1	1	1	0,999	33	26	13	0,271
N=94	Sì	4	1	1		8	12	2	

Tabella 32: Riepilogo dati anamnestici dei soggetti reclutati per lo studio caso-controllo

SPECIE	CAVALLO	407	MANTELLO	CHIARO	182	
	ASINO	38		SCURO	244	
	MULO	0		ND	19	
SESSO	MASCHIO	57	STABILAZIONE	SINGOLO	GRUPPO	ND
	MASCHIO CASTRATO	183	INTERNA	166	3	71
	FEMMINA	191	ESTERNA	35	84	28
	ND	14	ENTRAMBI	10	13	14
RAZZA	RAZZE LOCALI	25	ND	9	9	9
	SELLA	271	VACCINAZIONE	NO	35	
	TROTTATORI	19		SI	399	
	GALOPPATORI	55		ND	1	
	ALTRO	33	SVERMINAZIONE	NO	10	
	ND	41		SI	423	
		ND		1		
ATTITUDINE	CARNE	7	ANTIPARASSITARI ESTERNI	NO	278	
	EQUESTRE/IPPICO	388		SI	142	
	LAVORO	5		ND	1	
	RISPORDUZIONE	31		NO	240	
	ND	13	ZECICHE	SI	166	
FASCIA DI ETÀ	0-6	136		ND	1	
	7-12	135				
	13-20	113				
	>20	28				
	ND	32				

*Tabella 33: Soggetti reclutati per lo studio caso controllo classificati per la presenza di ciascuno dei sintomi elencati nella scheda di accompagnamento*

	N°ANIMALI
ANEMIA	186
ATASSIA	39
DEBOLEZZA	160
DIMAGRIMENTO	68
DOLORI COLICI	35
EDEMI	38
EMATURIA	30
FEBBRE	232
ITTERO	194
EMORRAGIE PETECCHIALI	32
INAPPETENZA	84
LETARGIA	40
LINFOADENOMEGALIA	10
TACHICARDIA	26
TACHIPNEA	34

*Tabella 34: Soggetti reclutati classificati per numero di sintomi presentati*

NUMERO DI SINTOMI	NUMERO DI ANIMALI
0	156
1	18
2	15
3	64
4	85
5	65
6	17
7	12
8	6
9	3
10	2
11	2

Tabella 35: Riepilogo generale delle analisi sierologiche e biomolecolari effettuate

		POSITIVO	NEGATIVO	NE
BABESIA CABALLI	IFI	15	111	319
	ELISA	11	343	0
	PCR	13	432	0
THEILERIA EQUI	IFI	30	98	317
	ELISA	127	318	0
	PCR	87	358	0
LEPTOSPIROSI	MAT	13	426	6
	PCR	0	433	12
ANAPLASMOSI	IFI	27	405	13
	PCR	0	421	24
ANEMIA INFETTIVA EQUINA	ELISA	0	439	6
	STRISCIO EMATICO	29	392	24

Tabella 36: Fattori di rischio e relativo p dell'analisi statistica per il caso generico e specifico

FATTORE DI RISCHIO	P CASO GENERICO	P SPECIFICO
SPECIE	0,086	0,317
SESSO	<b>0,013</b>	0,103
STABULAZIONE SINGOLA/GRUPPO	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
STABULAZIONE INTERNA/ESTERNA	<b>&lt;0,001</b>	0,719
RAZZA	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
ATTITUDINE	<b>0,012</b>	0,380
CLASSE DI ETÀ	<b>0,023</b>	0,053
MANTELLLO	0,431	0,719
INTRODUZIONE RECENTE	0,301	0,333
VACCINAZIONE	<b>&lt;0,001</b>	0,132
SVERMINAZIONE	0,561	0,078
ANTIPARASSITARIO	0,191	0,054
PRESENZE DI ZECHE	<b>0,025</b>	<b>&lt;0,001</b>

*Tabella 37: Sintomi e relativo p dell'analisi statistica per il caso generico*

SINTOMO	P CASO GENERICO
ANEMIA	0,900
ATASSIA	0,351
DEBOLEZZA	0,639
DIMAGRIMENTO	0,299
DOLORI COLICI	0,754
EDEMI	<0,05
EMATURIA	0,621
FEBBRE	0,052
ITTERO	<0,05
EMORRAGIE PETECCHIALI	<0,01
INAPPETENZA	0,471
LETARGIA	0,738
LINFOADENOMEGALIA	<0,05
TACHICARDIA	<0,01
TACHIPNEA	0,477

Tabella 38: Parametri ematobiochimici e relativo p dell'analisi statistica per caso generico e specifico

PARAMETRO	P CASO GENERICO	P CASO SPECIFICO	PARAMETRO	P CASO GENERICO	P CASO SPECIFICO
Antiossidanti totali	0,15		Eosinofili (%)	0,178	
AST	0,168		Basofili	<b>&lt;0,001</b>	
Azoto	0,504		Basofili (%)	<b>&lt;0,01</b>	
Bilirubina Totale	0,065	0,8	Globuli rossi	<b>&lt;0,05</b>	0,75
Bilirubina Diretta	<b>&lt;0,01</b>	0,32	Emoglobina	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>
Bilirubina Indiretta	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,05</b>	Ematocrito	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
CK	0,864		MCV	0,999	
Creatinina	0,549		MCH	0,821	
GGT	0,230		MCHC	0,152	
LDH	0,252		PLT	<b>&lt;0,01</b>	0,06
Radicali liberi	0,845		PCT	0,374	
CD4+	0,548		PDW	0,999	
CD8+	0,195		RDW	0,123	
WBC	<b>&lt;0,01</b>	<b>&lt;0,01</b>	MPV	0,205	
Neutrofili	0,613		Proteine totali	0,150	
Neutrofili segmentati (%)	<b>&lt;0,05</b>		Albumina	0,065	
Neutrofili banda (%)	0,5		Alfa1	0,173	
Linfociti	<b>&lt;0,01</b>		Alfa 2	<b>&lt;0,05</b>	0,73
Linfociti (%)	0,221		Beta	0,149	
Monociti	<b>&lt;0,001</b>		Gamma	<b>&lt;0,001</b>	0,13
Monociti (%)	0,059		Rapporto A/G	0,259	
Eosinofili	0,606				

## ALLEGATO 2: GRAFICI

Grafico 1: Contributo nel rilevare la positività per B. caballi (a) e T. equi (b), in termini di percentuale cumulativa, di due metodi sierologici (IFAT, ELISA e Fuller® VMRD®) e di PCR (PCR Genesis® e della letteratura, Kim et al., 2008, Bhoora et al., 2010), su 274 campioni di equidi in quattro algoritmi diagnostici ipotetici in cui solo i negativi al test precedente sono analizzati con il successivo. In ordine di esecuzione

A: ELISA, IFAT, PCR Genesis®, PCR Letteratura;

B: ELISA, IFAT, Letteratura PCR, PCR Genesis®;

C: IFAT, ELISA, PCR Genesis®, PCR Letteratura;

D: IFAT, ELISA, PCR Letteratura, PCR Genesis®.

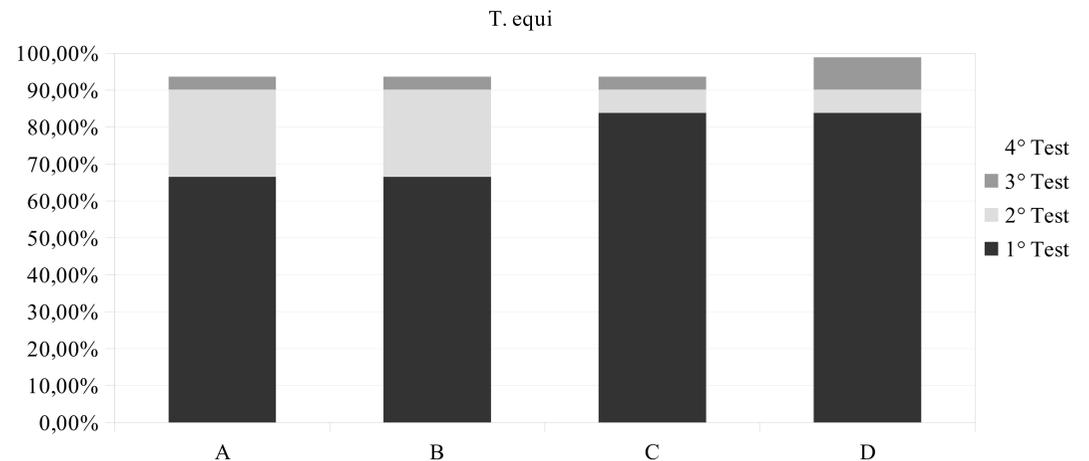
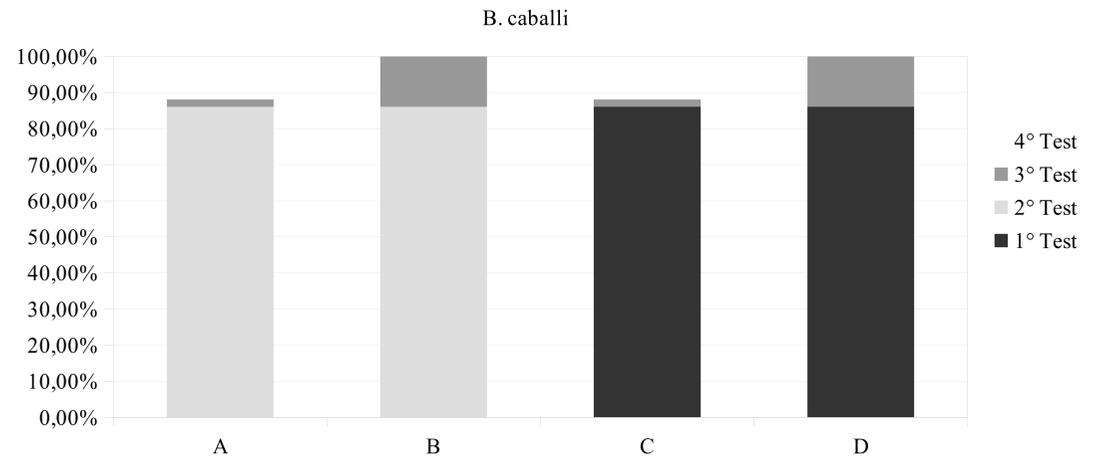


Grafico 2: Risultati delle analisi biochimiche sui soggetti negativi: per ogni parametro è indicato il numero di soggetti che hanno presentato una diminuzione (rosso) o un'aumento (blu) rispetto al range di normalità

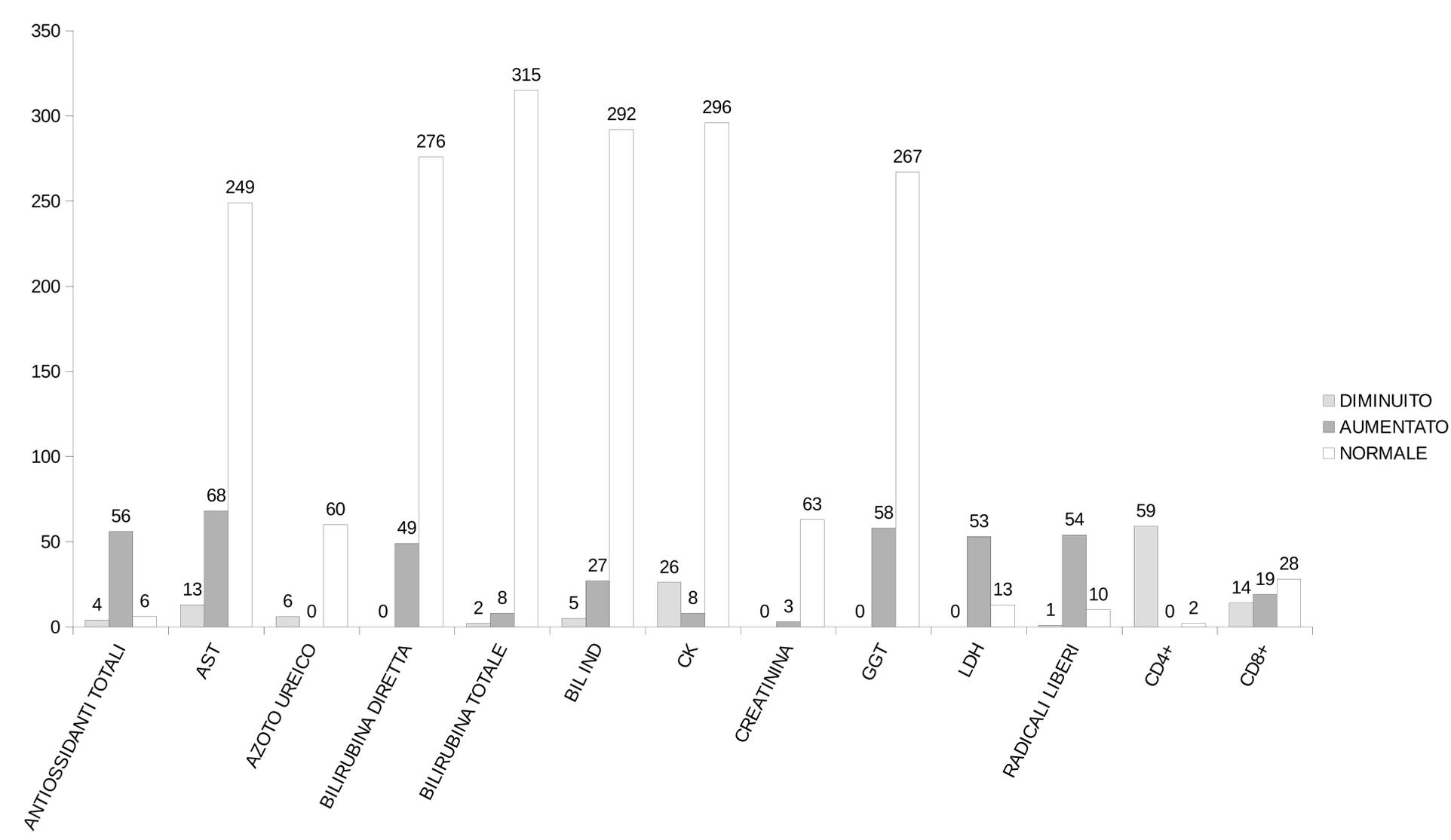


Grafico 3: Risultati delle analisi ematologiche sui soggetti negativi: per ogni parametro è indicato il numero di soggetti che hanno presentato una diminuzione (rosso) o un'aumento (blu) rispetto al range di normalità

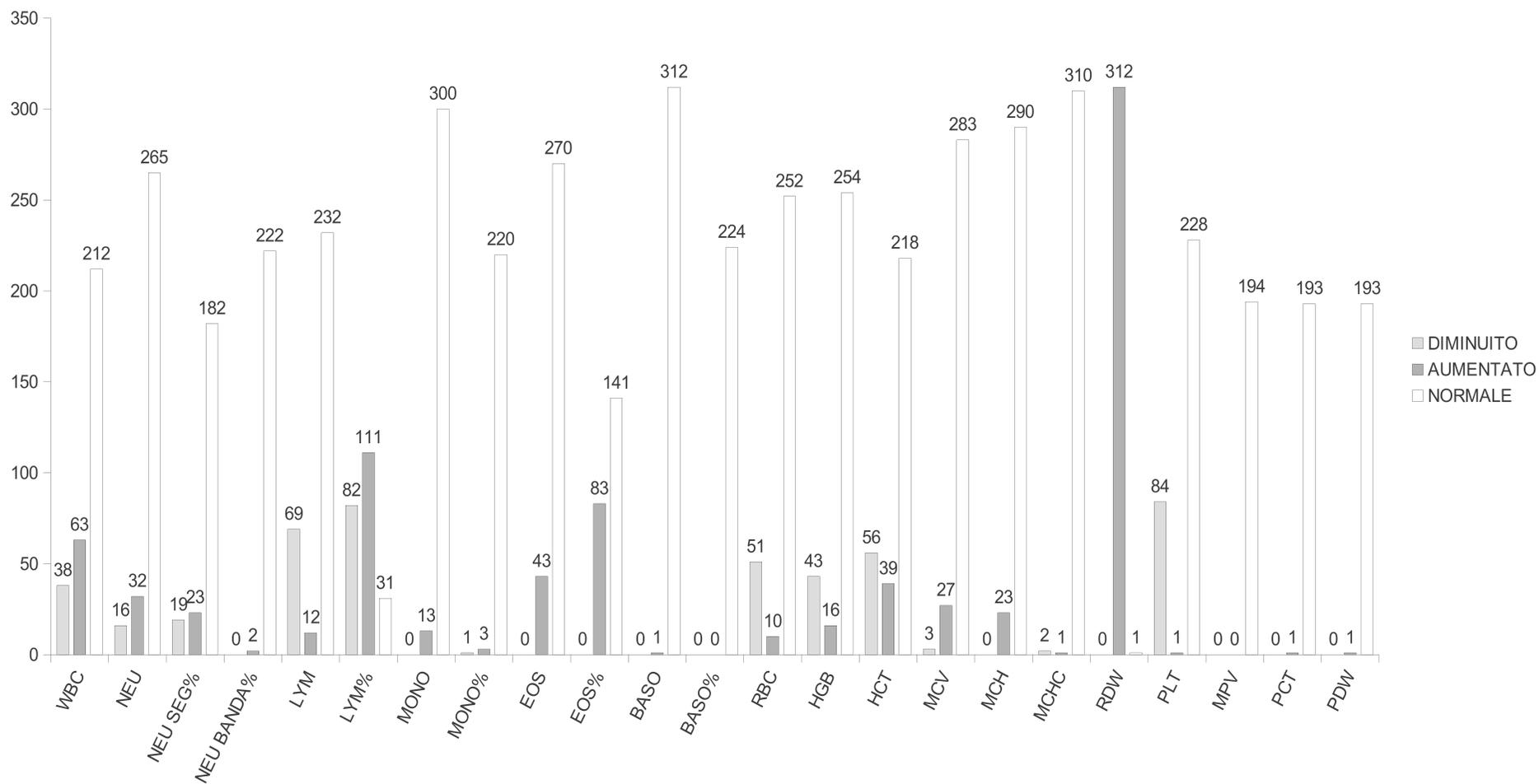


Grafico 4: Risultati del protidogramma sui soggetti negativi: per ogni parametro è indicato il numero di soggetti che hanno presentato una diminuzione (rosso) o un'aumento (blu) rispetto al range di normalità

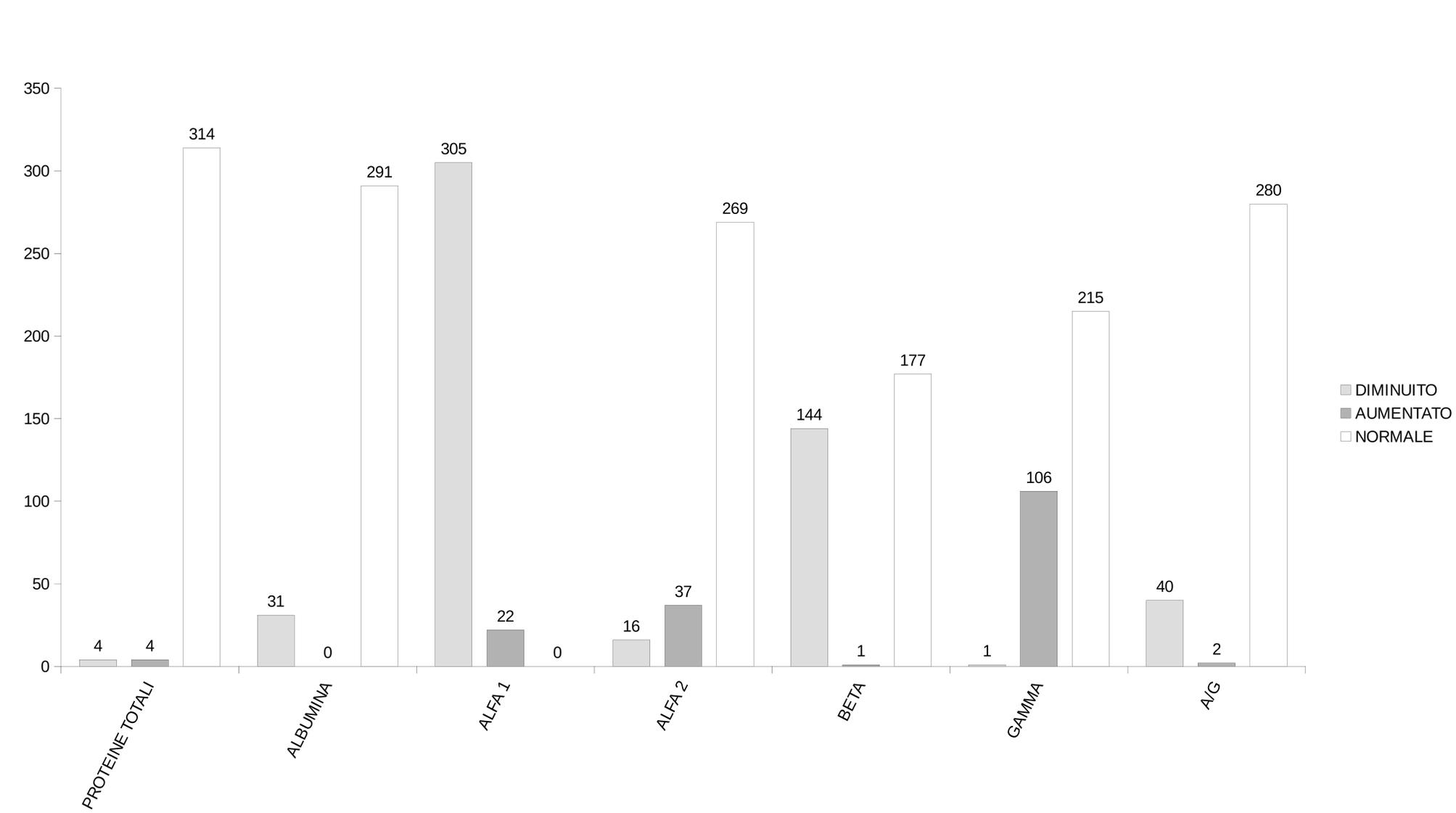


Grafico 5: Risultati delle analisi biochimiche sui casi confermati: per ogni parametro è indicato il numero di soggetti che hanno presentato una diminuzione (rosso) o un'aumento (blu) rispetto al range di normalità

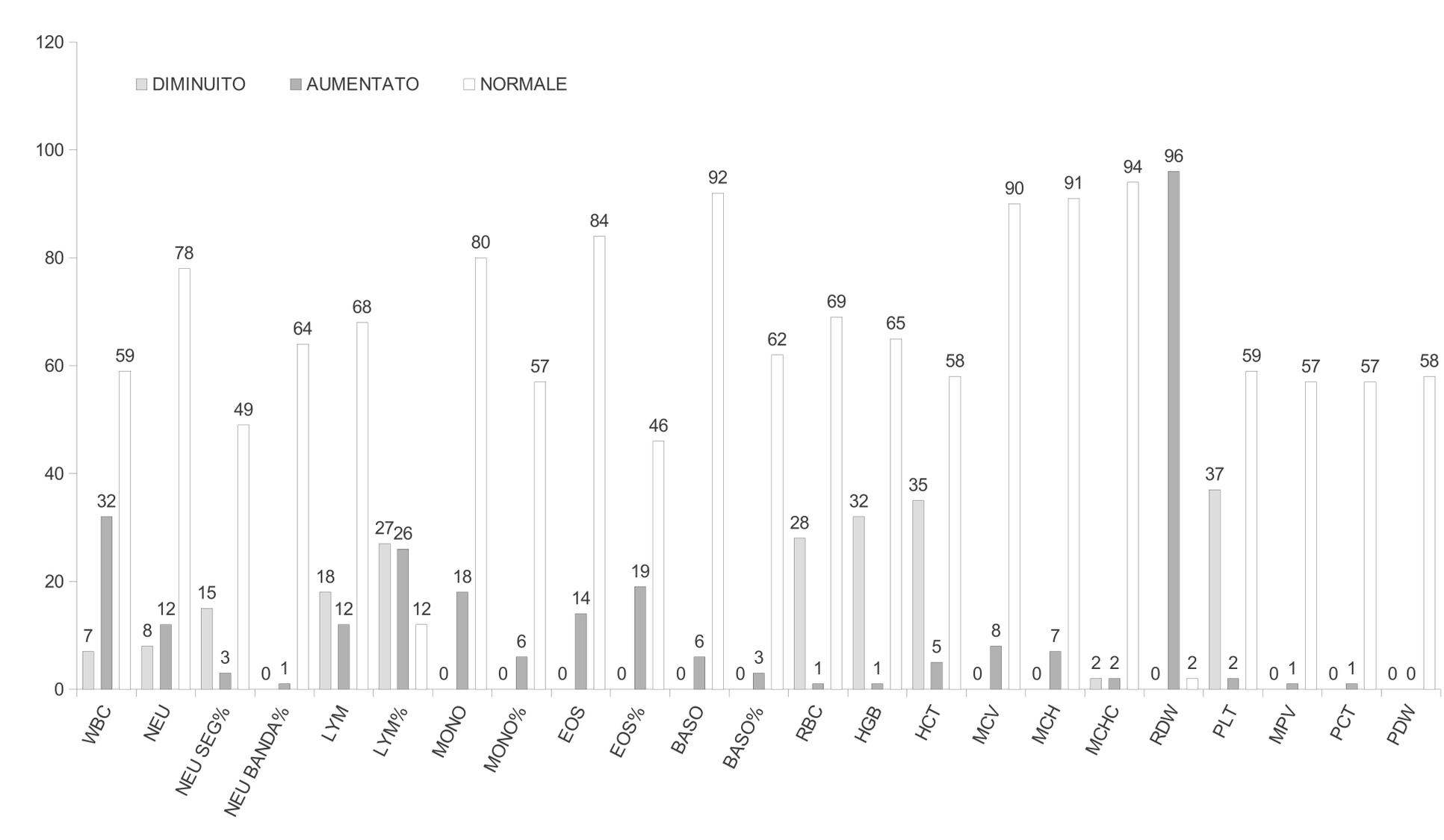


Grafico 6: Risultati delle analisi ematologiche sui casi confermati: per ogni parametro è indicato il numero di che hanno presentato una diminuzione (rosso) o un'aumento (blu) rispetto al range di normalità

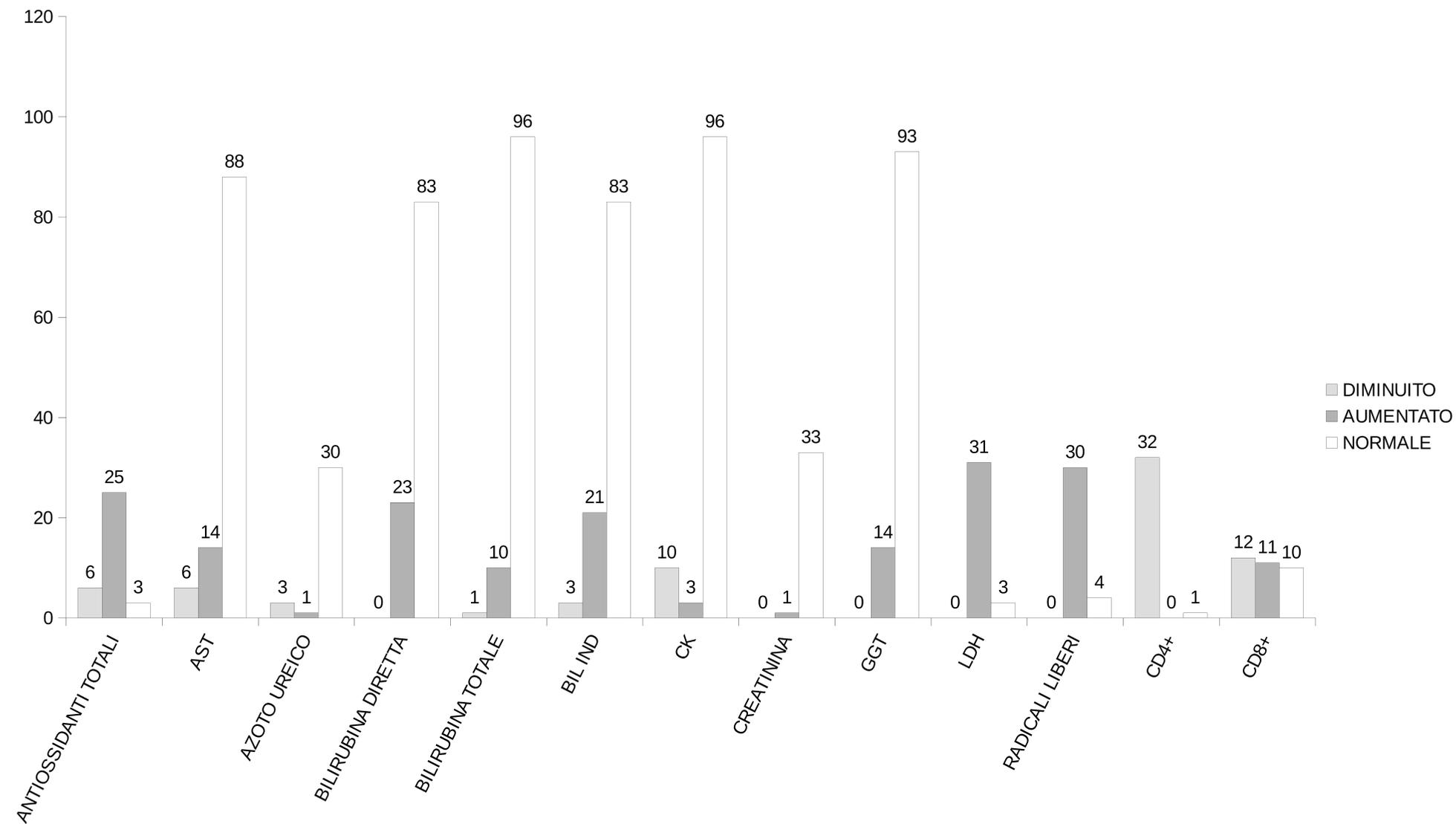
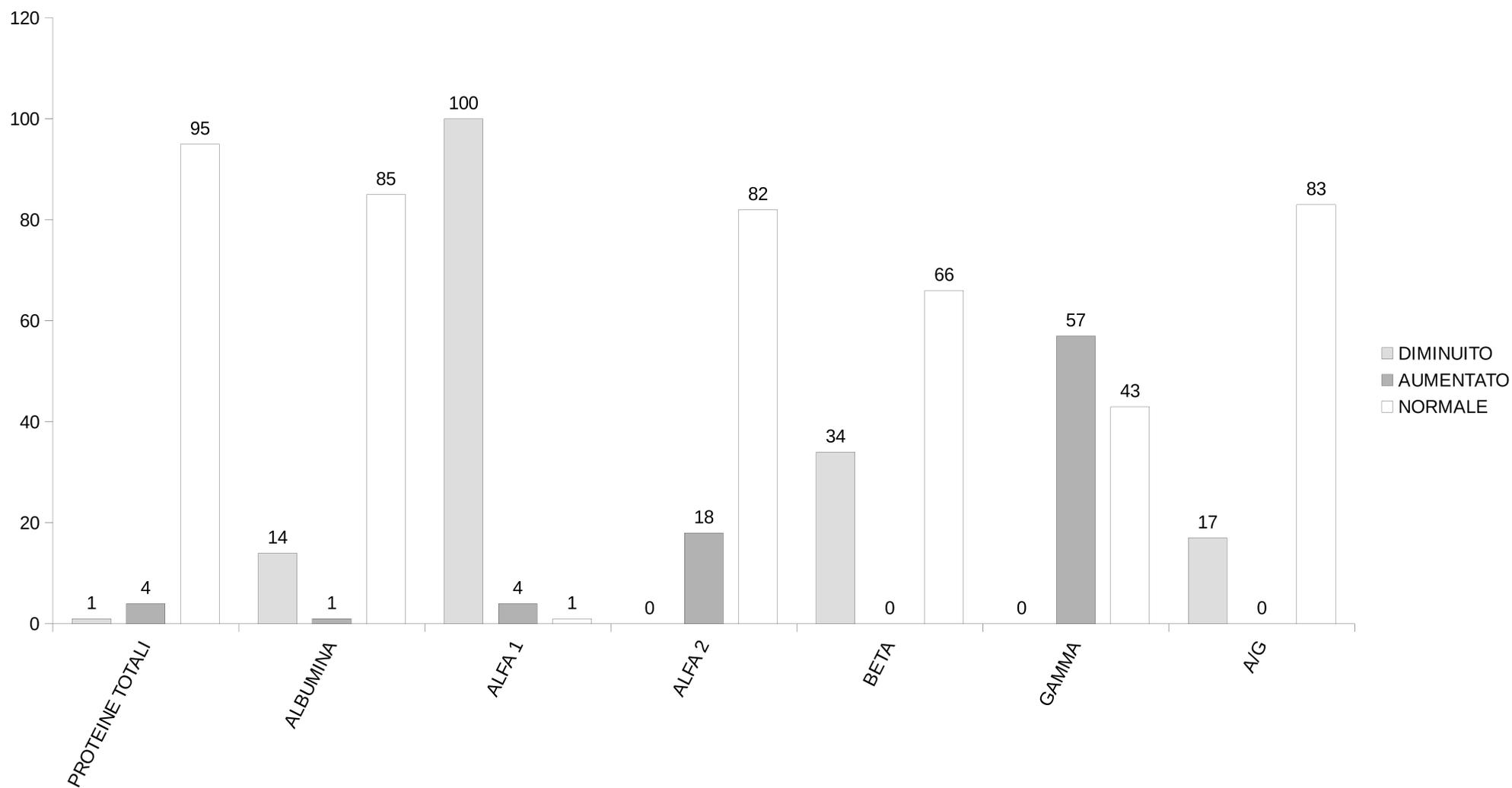


Grafico 7: Risultati del protidogramma sui casi confermati: per ogni parametro è indicato il numero di che hanno presentato una diminuzione (rosso) o un'aumento (blu) rispetto al range di normalità



**ALLEGATO 3: FIGURE**

Figura 1: Prevalenze sierologiche e in PCR per *T. equi* (A) e *B. caballi* (B) per ogni provincia. Il primo numero è la prevalenza sierologica, il secondo numero è la prevalenza in PCR. La posizione delle province in Italia è mostrato in basso a sinistra. La stella in figura rappresenta posizione di Aurunci.

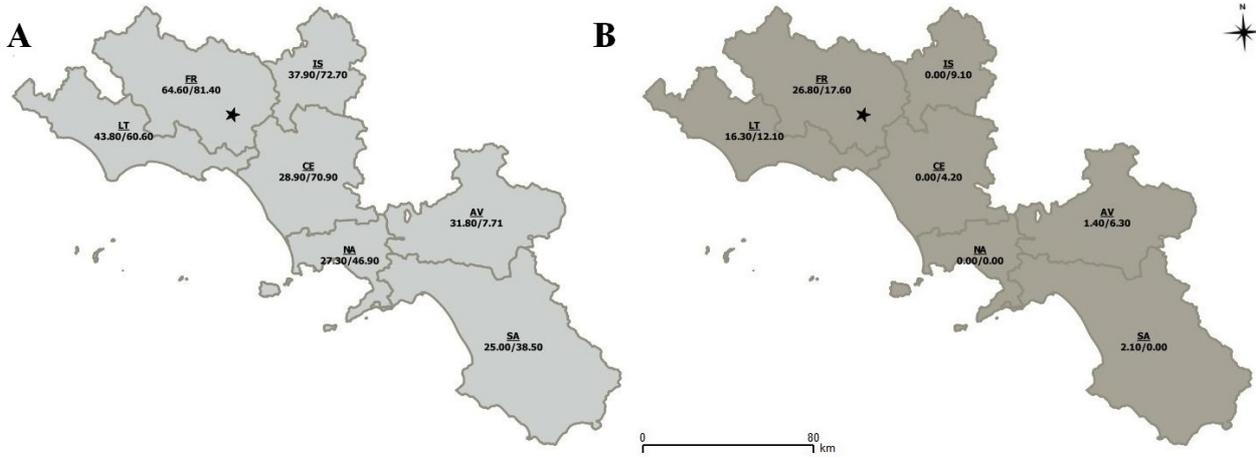


Figura 2: Albero filogenetico costruito con le sequenze per *T. equi* V4

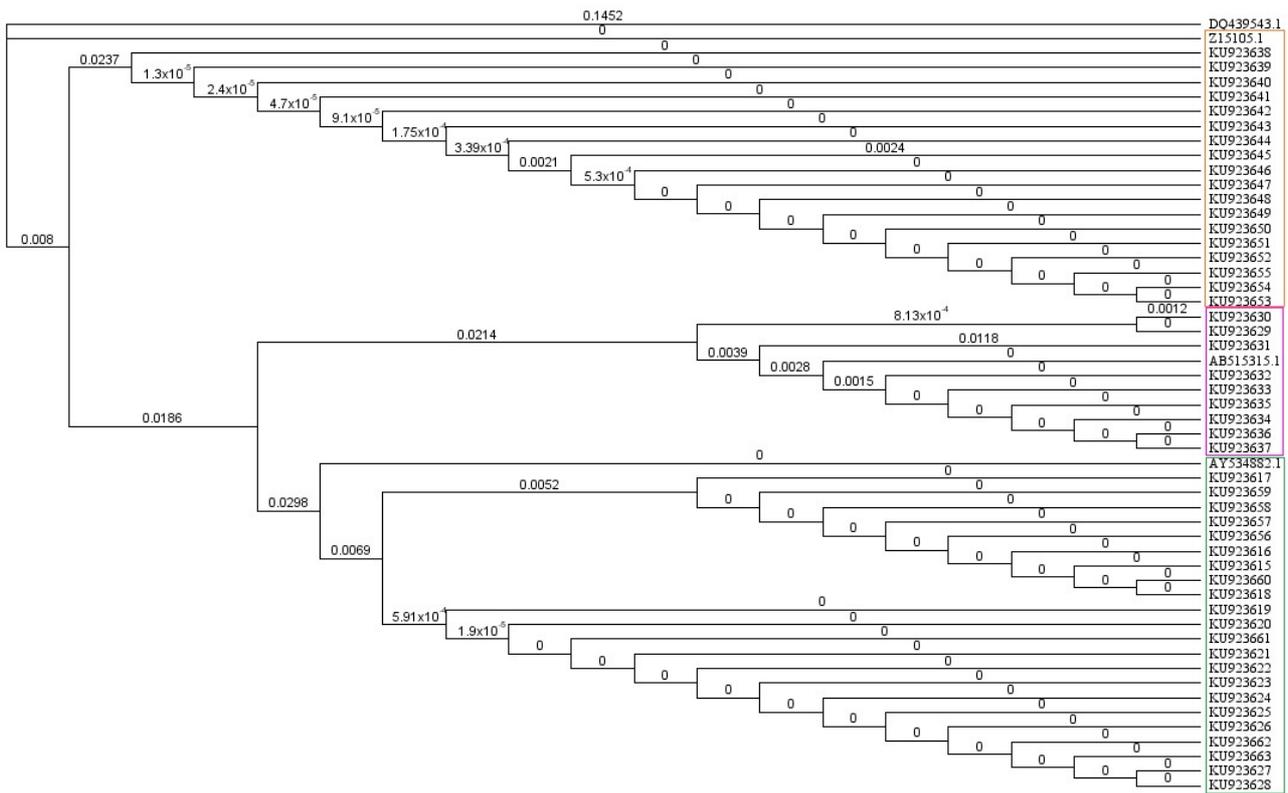


Figura 3: Albero filogenetico costruito con le sequenze per *B.caballi* V4

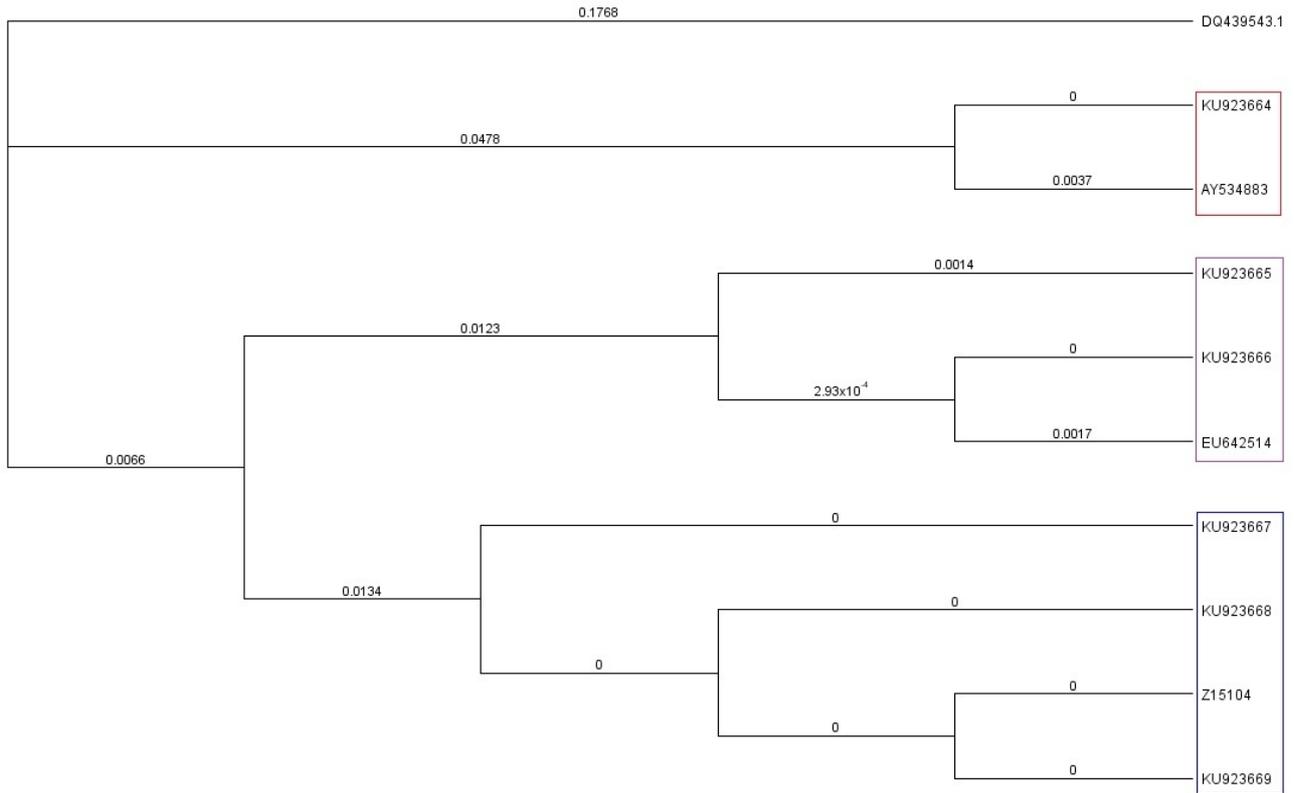


Figura 4: Albero filogenetico costruito con le sequenze per EMA

