



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



CENTRO
REFERENZA
NAZIONALE
MALATTIE
DEGLI EQUINI

Giornata di Studio

Il calo di rendimento del cavallo: Problemi di management e di origine infettiva

La diagnostica di laboratorio e l'importanza dei
metodi diretti per la valutazione dello stato
sanitario per piroplasmosi nel cavallo



(The Little Yellow Horses,
1912 - Franz Marc)

Dott. Roberto Nardini



Background: da cosa nasce lo studio?

- Disponibilità di **test biomolecolari**;
- **Discrepanze** tra test sierologici e biomolecolari;
- Necessità di un algoritmo migliore per **interpretare i risultati** dei test in supporto ai clinici, anche in funzione della terapia;



Diagnosi di laboratorio

Table 1. Test methods available for the diagnosis of equine piroplasmosis and their purpose

Method	Purpose					
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection	Contribute to eradication policies	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection - surveillance	Immune status in individual animals or populations post-vaccination
Agent identification¹						
Microscopic examination	-	+	-	++	+	n/a
PCR	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Detection of immune response²						
IFAT	++	++	++	+++	++	n/a
C-ELISA	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
CFT	+	+	+	+	+	n/a

Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors severely limits its application; - = not appropriate for this purpose; n/a = not applicable.

Although not all of the tests listed as category +++ or ++ have undergone formal validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

PCR = polymerase chain reaction; IFAT = indirect fluorescent antibody test;

C-ELISA = competitive enzyme-linked immunosorbent assay; CFT = complement fixation test.



Diagnosi di laboratorio

Table 1. Test methods available for the diagnosis of equine piroplasmosis and their purpose

Method	Purpose					
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection	Contribute to eradication policies	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection - surveillance	Immune status in individual animals or populations post-vaccination
Agent identification¹						
Microscopic examination	-	+	-	++	+	n/a
PCR	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Detection of immune response²						
IFAT	++	++	++	+++	++	n/a
C-ELISA	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
CFT	+	+	+	+	+	n/a

Key: +++ = recommended method; ++ = suitable method; + = may be used in some situations, but cost, reliability, or other factors severely limits its application; - = not appropriate for this purpose; n/a = not applicable.

Although not all of the tests listed as category +++ or ++ have undergone formal validation, their routine nature and the fact that they have been used widely without dubious results, makes them acceptable.

PCR = polymerase chain reaction; IFAT = indirect fluorescent antibody test;

C-ELISA = competitive enzyme-linked immunosorbent assay; CFT = complement fixation test.

L'OIE **non**
prescrive più un
metodo per le
movimentazioni
internazionali



**Normativa del
paese importatore**



La sola sierodiagnosi è sufficiente a definire lo stato sanitario dell'equide ?





- Diagnosi clinica;
- Affidabilità dei test sierologici;
- Dati di validazione;
- Sieropositivo = Animale Infetto?
- Test sierologici sufficienti per decidere di intraprendere una terapia?



Impostazione dello studio



1. Identificare le PCR più sensibili tra quelle disponibili in letteratura

2. Analizzare un campione di casi sospetti e animali asintomatici

3. Analisi dei dati ottenuti confrontando i risultati sierologici e biomolecolari



PCR

Da un confronto preliminare sono state scelti due protocolli di PCR Real time, per la loro *sensibilità* (Limite di rilevabilità e numero di positivi) e *specificità* (positivi confermati con il sequenziamento). Entrambe si basano sul rilevamento di segmenti del gene 18s che codificano per l'RNA ribosomale. Queste due PCR sono state

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



PCR

Per *B. caballi* si è scelto il protocollo proposto da Bhoora et al., 2010 che amplifica un frammento di 95 bp nella regione ipervariabile V4.

Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweygarth, E., Jongejan, F., Collins, N.E., 2010. 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.* 168, 201–211, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.011>.



PCR

Per *B. caballi* si è scelto il protocollo proposto da Bhoora et al., 2010 che amplifica un frammento di 95 bp nella regione ipervariabile V4.

Bhoora, R., Quan, M., Franssen, L., Butler, C.M., Van der Kolk, J.H., Guthrie, A.J., Zweygarth, E., Jongejan, F., Collins, N.E., 2010. 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.* 168, 201–211, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.11.011>.

Per *T. equi* si è scelto il protocollo proposto da Kim et al., 2008 che amplifica un frammento di 81 bp esterno alla regione ipervariabile V4.

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>.



Popolazione di studio

Indagine retrospettiva su 540 campioni di siero e sangue con anticoagulante da equidi del Centro-Italia classificati come

Sospetti (n=106) **Non sospetti** (n=434)

Sospetto clinico: $T > 38,5^{\circ}\text{C}$ e almeno un segno tra: ittero, anemia, ematuria o petecchie emorragiche



Test sierologici

C-ELISA: *B. caballi/B. equi* Antibody Test Kit C-ELISA VMRD[®], USA. Utilizzano antigeni ricombinanti:

Gene EMA 1 per *T. equi*

Gene RAP 1 per *B. caballi*



IFAT: Kit Fuller[®] Vetrini con globuli rossi infettati con *T. equi* e *B. caballi*



RISULTATI

	T. equi (540)		B. cavalli (540)	
	PCR + (315)	PCR - (225)	PCR + (40)	PCR - (500)
ELISA +	266	107	12	48
ELISA -	49	118	28	452
	PCR + (136)	PCR - (138)	PCR + (14)	PCR - (260)
IFAT +	116	29	7	36
IFAT -	20	109	7	224

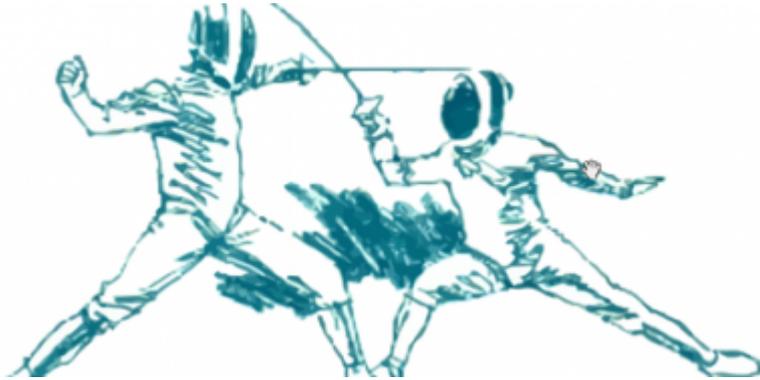


RISULTATI

	T. equi (540)		B. cavalli (540)	
	PCR + (315)	PCR - (225)	PCR + (40)	PCR - (500)
ELISA +	266	107	12	48
ELISA -	49	118	28	452
	PCR + (136)	PCR - (138)	PCR + (14)	PCR - (260)
IFAT +	116	29	7	36
IFAT -	20	109	7	224



RISULTATI

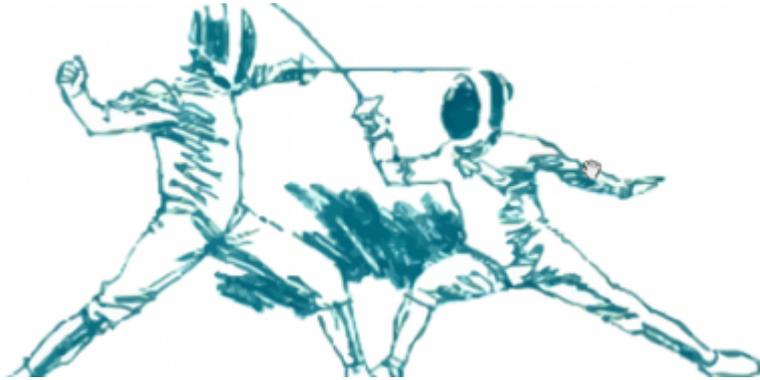


PCR vs Sierologia

		T. equi	B. caballi
ELISA	Se (%)	84,44	30,00
	Sp (%)	52,44	90,40
IFAT	Se (%)	85,29	50,00
	Sp (%)	78,99	86,15



RISULTATI

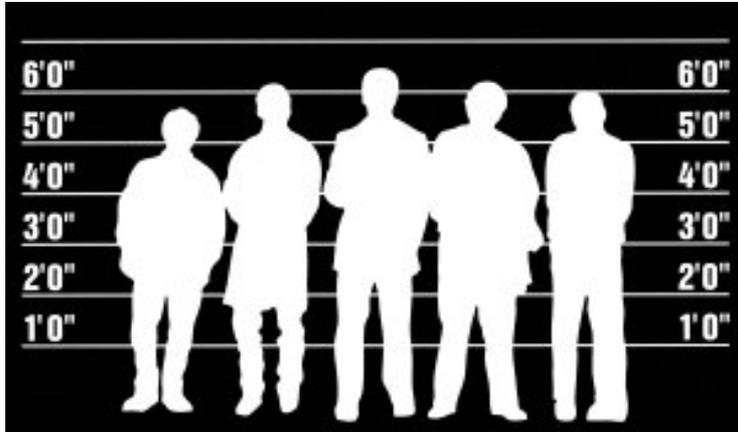


PCR vs Sierologia

		T. equi	B. caballi
ELISA	Se (%)	84,44	30,00
	Sp (%)	52,44	90,40
IFAT	Se (%)	85,29	50,00
	Sp (%)	78,99	86,15



RISULTATI



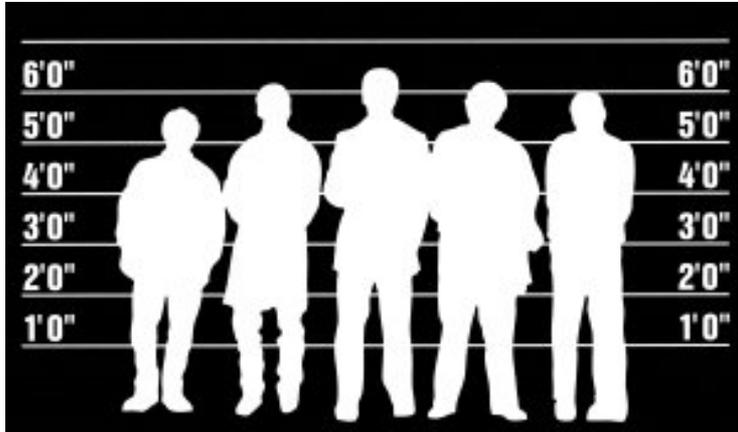
Non sospetti (169)

% di positivi tra i non sospetti

PCR +	B. caballi	10	6
	T. equi	100	59
ELISA +	B. caballi	0	0
	T. equi	92	54
IFAT+	B. caballi	33	20
	T. equi	101	60



RISULTATI



Non sospetti (169)

% di positivi tra i non sospetti

PCR +	B. caballi	10	6
	T. equi	100	59 ←
ELISA +	B. caballi	0	0
	T. equi	92	54 ←
IFAT+	B. caballi	33	20
	T. equi	101	60 ←



RISULTATI

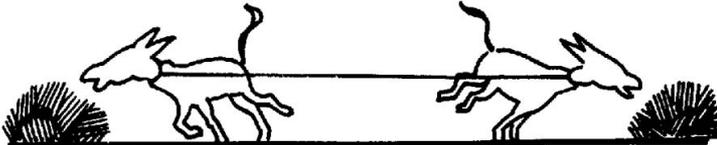
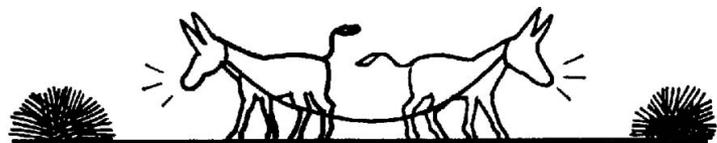


		Non sospetti	ELISA +	IFAT+	% aggiuntiva di positivi rilevati
PCR +	B. cavalli	10	0	6	40
	T. equi	100	74	84	16/26



RISULTATI

THEILERIA EQUI (274)	ELISA +	IFAT +	PCR +	(%) POSITIVI AD ALMENO UN TEST
	42	52,9	49,6	62,4



BABESIA CABALLI (274)	ELISA +	IFAT +	PCR +	(%) POSITIVI AD ALMENO UN TEST
	0	15,7	5,1	18,2



RISULTATI DISCORDI?

Siero pos/PCR neg

- Il titolo anticorpale rimane rilevabile dopo che il parassita è stato eliminato
- Parassitemia inferiore al limite di rilevabilità della PCR
- Possibile presenza di **variazioni di sequenza** nel **gene 18s rRNA** (Bhoora et al., 2009)
- Cross-reattività in IFAT (Bruning et al., 1997)



RISULTATI DISCORDI?

Siero pos/PCR neg

- Il titolo anticorpale rimane rilevabile dopo che il parassita è stato eliminato
- Parassitemia inferiore al limite di rilevabilità della PCR
- Possibile presenza di **variazioni di sequenza** nel **gene 18s rRNA** (Bhoora et al., 2009)
- Cross-reattività in IFAT (Bruning et al., 1997)



RISULTATI DISCORDI?

Siero neg/PCR pos

- **Fase precoce di infestazione**, precedente la risposta anticorpale (Bhoora et al., 2010)
- **Variazioni antigeniche** responsabili di sensibilità bassa (non inclusivo)



La sola sierodiagnosi è sufficiente a definire lo stato sanitario dell'equide ?



La sola sierodiagnosi è sufficiente a definire lo stato sanitario dell'equide ?



CONCLUSIONI

1. L'utilizzo contestuale di **metodi sierologici e biomolecolari**, **incrementa la sensibilità della diagnosi** soprattutto in **casi precoci**.
2. Stato sanitario definito con la **sierologia**, ai fini delle movimentazioni internazionali, risulta **inefficiente** in quanto può risultare in **sanzioni e perdite economiche** in caso di controllo sierologico in un animale con risposta anticorpale al limite della rilevabilità del test.
3. La **corretta identificazione dello status** del soggetto è utile anche in previsione della **terapia farmacologica**, che può presentare effetti collaterali anche gravi



CONCLUSIONI

1. L'utilizzo contestuale di **metodi sierologici e biomolecolari**, **incrementa la sensibilità della diagnosi** soprattutto in **casi precoci**.
2. Stato sanitario definito con la **sierologia**, ai fini delle movimentazioni internazionali, risulta **inefficiente** in quanto può risultare in **sanzioni e perdite economiche** in caso di controllo sierologico in un animale con risposta anticorpale al limite della rilevabilità del test.
3. La **corretta identificazione dello status** del soggetto è utile anche in previsione della **terapia farmacologica**, che può presentare effetti collaterali anche gravi



CONCLUSIONI

1. L'utilizzo contestuale di **metodi sierologici e biomolecolari**, **incrementa la sensibilità della diagnosi** soprattutto in **casi precoci**.
2. Stato sanitario definito con la **sierologia**, ai fini delle movimentazioni internazionali, risulta **inefficiente** in quanto può risultare in **sanzioni e perdite economiche** in caso di controllo sierologico in un animale con risposta anticorpale al limite della rilevabilità del test.
3. La **corretta identificazione dello status** del soggetto è utile anche in previsione della **terapia farmacologica**, che può presentare effetti collaterali anche gravi



CONCLUSIONI



PCR QUANTITATIVA (IN FASE DI OTTIMIZZAZIONE):

Correlazione tra Ct della PCR Real Time e presenza di un'**infestazione attiva**: utile, congiuntamente alla valutazione della **sintomatologia** e degli **esiti ematobiochimici**, per decidere la **terapia**.



CONCLUSIONI



PCR QUANTITATIVA:

Correlazione tra Ct della PCR Real Time e presenza di un'**infestazione attiva**: utile, congiuntamente alla valutazione della **sintomatologia** e degli **esiti ematobiochimici**, per decidere la **terapia**.

Rilevata una **differenza significativa** tra i valori di Ct dei casi (≤ 30) e dei controlli (≥ 35).



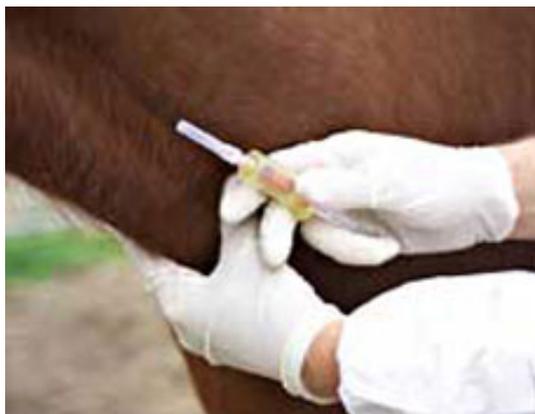
CONCLUSIONI

4. Effettuare sempre un prelievo di sangue con e senza anticoagulante, e richiedere sempre ELISA e PCR per piroplasmosi.



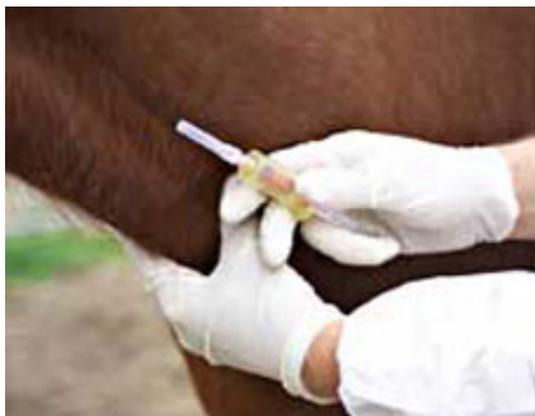
Diagnostica: analisi richieste

2016 presso CERME	T.equi	B.caballi
Totale soggetti esaminati	467	467
Richiesto solo sierologico	199	194
Richiesto sierologico + PCR	247	253



Diagnostica: analisi richieste

2016 presso CERME	T.equi	B.caballi
Totale soggetti esaminati	467	467
Richiesto solo sierologico	199	194
Richiesto sierologico + PCR	247	253
% sierologico + PCR	53	54



Diagnostica: analisi richieste

2016 presso IZSLT	T.equi	B.caballi
Totale soggetti esaminati	467	467
Richiesto solo sierologico	199	194
Richiesto sierologico + PCR	247	253
% sierologico + PCR	53	54



Per la PCR:

Campione con EDTA

~~CITRATO~~

~~LITIO EPARINA~~



Grazie

