



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

**Convegno**

**L'attività di Ricerca Corrente presso l'IZS Lazio e Toscana:  
principali risultati e loro trasferibilità operativa**



“The Great Wave Off Kanagawa” Katsushika Hokusai

## **Progetto IZS LT 16/11 RC**

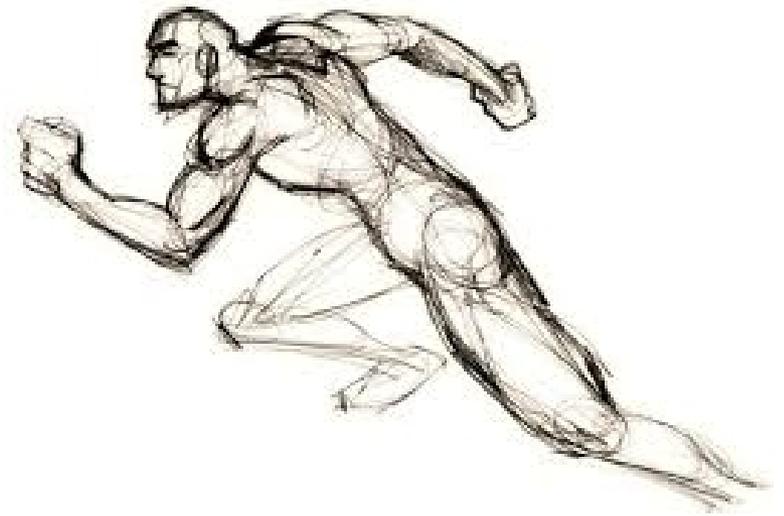
Stima delle prevalenze delle infezioni da *Babesia* caballi, *Theileria* equi ed *Anaplasma phagocytophilum* nelle Regioni Lazio e Toscana. Messa a punto di metodi quantitativi ed analisi di differenti metodi diagnostici in uso in relazione allo stato sanitario dei soggetti infetti.

*Dott. Roberto Nardini*



# Summary

- Premesse della ricerca
- Obiettivi
- Metodi e risultati
- Trasferibilità e risvolti applicativi





## Premesse della ricerca

- Piroplasmosi importanti dal punto di vista economico, in quanto causano perdite per ridotte performance e blocco delle movimentazioni
- Malattia endemica in Italia
- Difficoltà diagnostiche (persistenza anticorpale)
- Trattamento presenta rischi collaterali anche gravi (*T.equi* in particolare)





# Obiettivi

**W.P.1.** Definire le prevalenza rispettivamente per *B. caballi*, *T. equi* ed *A. phagocytophilum* in popolazioni autoctone Centro Italia.

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

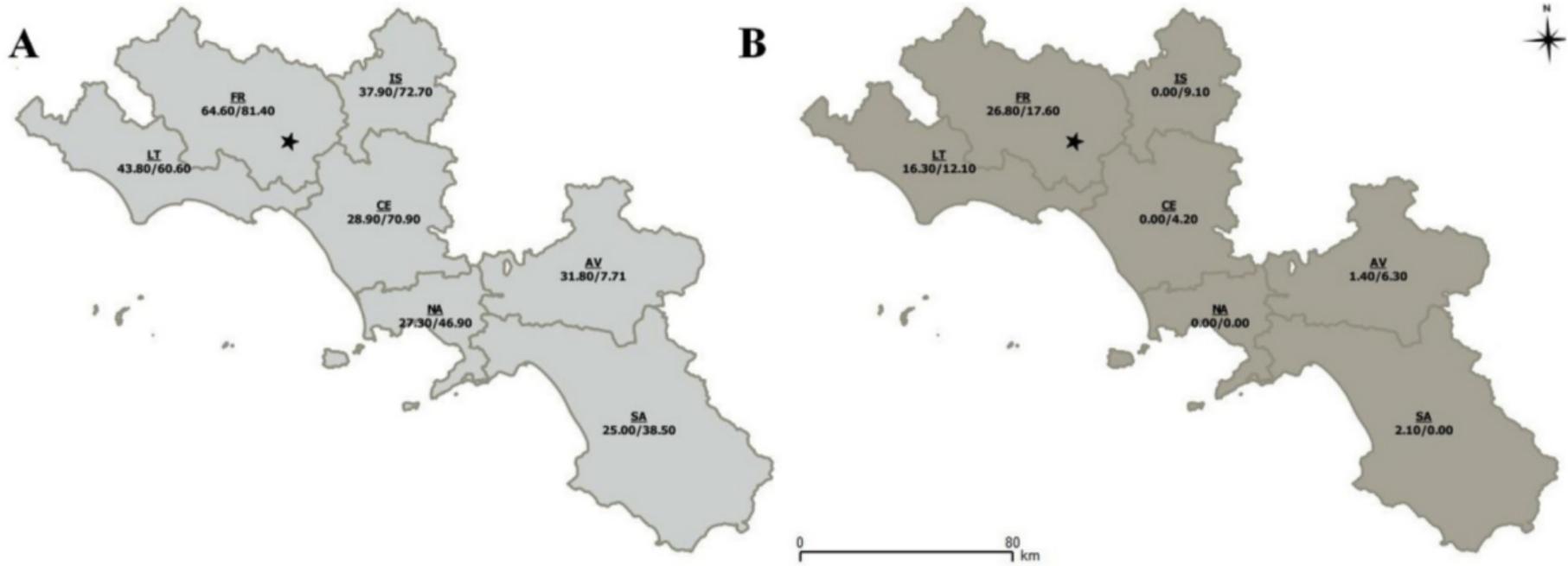
**W.P.3.** Studio caso/controllo per l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi/anaplasmosi



# Metodi e risultati

## W.P.1: Studio di prevalenza

673 campioni analizzati in ELISA e PCR





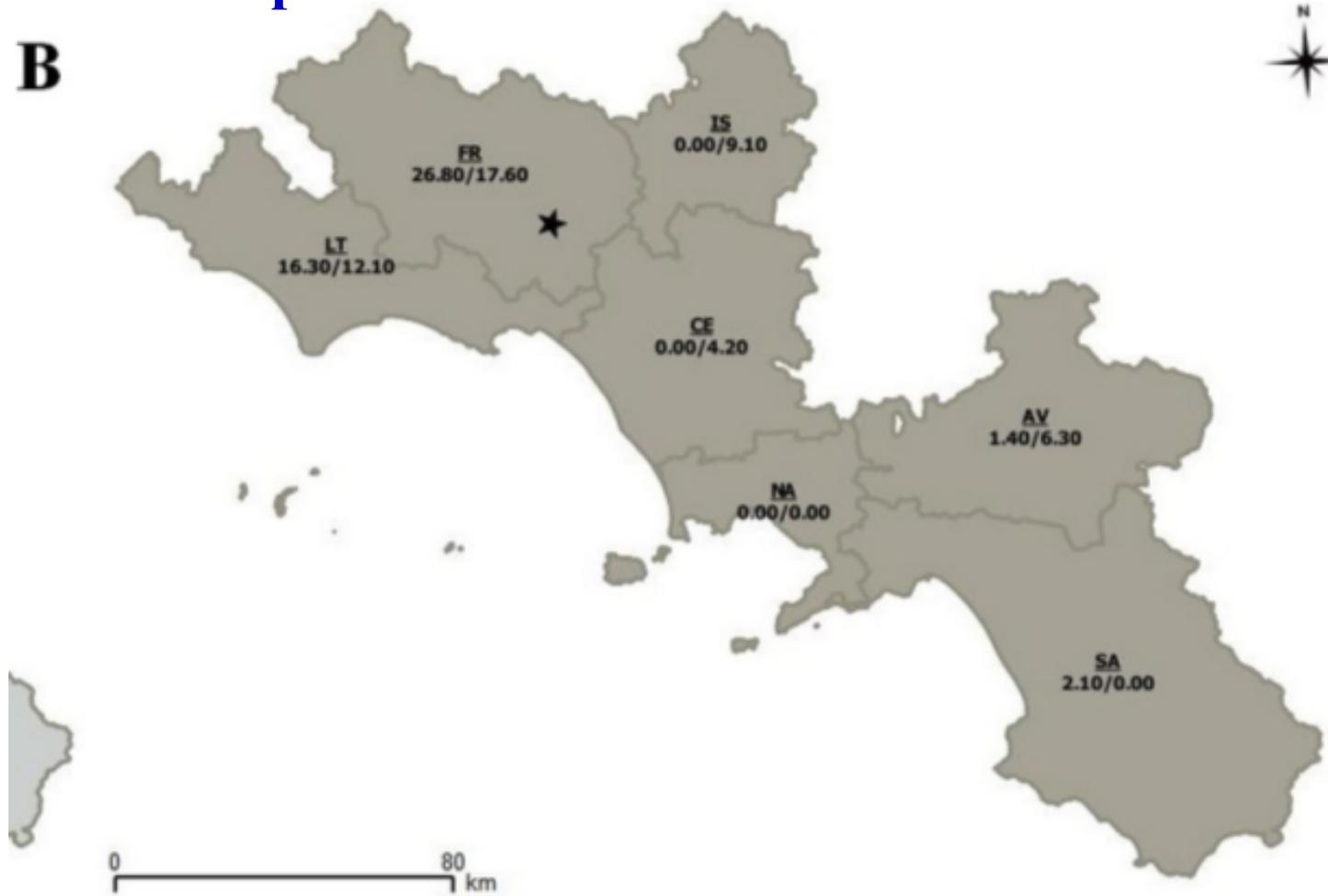
## W.P.1: Studio di prevalenza





## W.P.1: Studio di prevalenza

**B**



## W.P.1: Studio di prevalenza

**Table 2**  
Results of multivariate logistic analysis of risk factors for *T. equi* seroprevalence. *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

Variables	Category	<i>p</i>	Odds ratio	95% CI
Gender	Male	a		
	Female	0.001	1.86	(1.27–2.71)
Age (years)	$\leq 6$	a		
	7–12	0.002	2.09	(1.32–3.31)
	>12	<0.0001	2.59	(1.61–4.16)
Breed	Foreign	a		
	Italian	<0.0001	3.57	(1.99–6.41)
	Mixed	0.002	2.51	(1.38–4.55)
Access to pasture	No	a		
	Yes	0.004	2.22	(1.29–3.83)
Land cover	>75% forest	a		
	50–75% crops	0.170	0.56	(0.25–1.27)
	50–75% forest	0.020	0.42	(0.20–0.87)
	Mixed	0.564	0.76	(0.29–1.95)
Soil type	Eutric Cambisol	a		
	Dystric cambisol	0.001	0.29	(0.14–0.60)
	Andosol	0.084	0.49	(0.21–1.10)
	Chromic Luvisol	0.002	3.16	(1.54–6.47)
Province location	Coastal	a		
	Inland	0.005	2.5	(1.33–4.74)

*N* = number of samples tested; 95% CI = confidence interval; *p* = value; *a* = baseline

**Table 4**

Results of multivariate logistic analysis of risk factors for *T. equi* and *B. caballi* PCR-positive prevalence. *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

<i>T. equi</i>				
Variables	Category	<i>p</i>	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		
	Dystric Cambisol	0.04	3.59	(1.49–8.66)
	Andosol	0.354	1.71	(0.55–5.29)
	Chromic Luvisol	0.001	4.55	(1.87–10.8)
Province location	Coastal	a		
	Inland	0.007	2.91	(1.33–6.35)
<i>B. caballi</i>				
Variables	Category	<i>p</i>	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		
	Dystric Cambisol	0.020	0.14	(0.03–0.74)
	Andosol	0.091	0.16	(0.02–1.34)
	Chromic Luvisol	0.749	0.85	(0.31–2.30)

*N* = number of samples tested; 95% CI = confidence interval; *p* = value; *a* = baseline.



## W.P.1: Studio di prevalenza

**Table 2**  
Results of multivariate logistic analysis of risk factors for *T. equi* seroprevalence. *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

Variables	Category	<i>p</i>	Odds ratio	95% CI
Gender	Male	a		
	Female	0.001	1.86	(1.27–2.71)
Age (years)	$\leq 6$	a		
	7–12	0.002	2.09	(1.32–3.31)
	>12	<0.0001	2.59	(1.61–4.16)
Breed	Foreign	a		
	Italian	<0.0001	3.57	(1.99–6.41)
	Mixed	0.002	2.51	(1.38–4.55)
Access to pasture	No	a		
	Yes	0.004	2.22	(1.29–3.83)
Land cover	>75% forest	a		
	50–75% crops	0.170	0.56	(0.25–1.27)
	50–75% forest	0.020	0.42	(0.20–0.87)
	Mixed	0.564	0.76	(0.29–1.95)
Soil type	Eutric Cambisol	a		
	Dystric cambisol	0.001	0.29	(0.14–0.60)
	Andosol	0.084	0.49	(0.21–1.10)
	Chromic Luvisol	0.002	3.16	(1.54–6.47)
Province location	Coastal	a		
	Inland	0.005	2.5	(1.33–4.74)

*N* = number of samples tested; 95% CI = confidence interval; *p* = value; *a* = baseline

**Table 4**  
Results of multivariate logistic analysis of risk factors for *T. equi* and *B. caballi* PCR-positive prevalence. *P* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

<i>T. equi</i>				
Variables	Category	<i>p</i>	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		
	Dystric Cambisol	0.04	3.59	(1.49–8.66)
	Andosol	0.354	1.71	(0.55–5.29)
	Chromic Luvisol	0.001	4.55	(1.87–10.8)
Province location	Coastal	a		
	Inland	0.007	2.91	(1.33–6.35)
<i>B. caballi</i>				
Variables	Category	<i>p</i>	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		
	Dystric Cambisol	0.020	0.14	(0.03–0.74)
	Andosol	0.091	0.16	(0.02–1.34)
	Chromic Luvisol	0.749	0.85	(0.31–2.30)

*N* = number of samples tested; 95% CI = confidence interval; *p* = value; *a* = baseline.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Metodi e risultati

## W.P.1: Studio di prevalenza

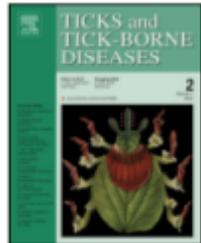
Ticks and Tick-borne Diseases 7 (2016) 462–469



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

### Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ttbdis](http://www.elsevier.com/locate/ttbdis)



*Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses  
in Central-Southern Italy: Sero-molecular survey  
and associated risk factors



Bartolomé Del Pino Leticia Elisa<sup>a</sup>, Nardini Roberto<sup>b</sup>, Veneziano Vincenzo<sup>c</sup>,  
Iacoponi Francesca<sup>b</sup>, Cersini Antonella<sup>b</sup>, Autorino Gian Luca<sup>b</sup>, Buono Francesco<sup>c</sup>,  
Scicluna Maria Teresa<sup>b,\*</sup>





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Metodi e risultati

### W.P.1: Studio di prevalenza

*Anaplasma phagocitophilum* non rilevato con ricerca antigene,  
solo 22 campini positivi in IFAT.



## Metodi e risultati

### W.P.2: Algoritmo diagnostico

Step 1: Confronto tra PCR disponibili in letteratura di tipo diverso e con target diversi (103 campioni di animali sintomatici e asintomatici)

<i>T. equi</i> PCR	PCR TECHNIQUE	TARGET	<i>B. caballi</i> PCR	PCR	TARGET
T 1	End point	Equine merozoite antigen gene	B 1	End point	Rhoptry associated protein complex gene
T 2	Nested	Equine merozoite antigen gene	B 2	Nested	Rhoptry associated protein complex gene
T 3	Real Time	V 4 Hypervariable region 18S RNA gene	B 3	Real Time	V 4 Hypervariable region 18S RNA gene
T 4	Real Time (Commercial kit)	Equine merozoite antigen gene	B 4	Real Time (Commercial kit)	18S RNA gene



## Metodi e risultati

### W.P.2: Algoritmo diagnostico

Step 1: Confronto tra PCR disponibili in letteratura di tipo diverso e con target diversi (103 campioni di animali sintomatici e asintomatici)

<i>T. equi</i> PCR	PCR TECHNIQUE	TARGET
T 1	End point	Equine merozoite antigen gene
T 2	Nested	Equine merozoite antigen gene
T 3	Real Time	V 4 Hypervariable region 18S RNA gene
T 4	Real Time (Commercial kit)	Equine merozoite antigen gene

<i>B. caballi</i> PCR	PCR	TARGET
B 1	End point	Rhoptry associated protein complex gene
B 2	Nested	Rhoptry associated protein complex gene
B 3	Real Time	V 4 Hypervariable region 18S RNA gene
B 4	Real Time (Commercial kit)	18S RNA gene





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Metodi e risultati

## W.P.2: Algoritmo diagnostico

3rd European EAVLD Congress - Pisa (Italy), October 12-15, 2014

019

### **EVALUATION OF PCR METHODS FOR THE MOLECULAR DETECTION OF BABESIA CABALLI AND THEILERIA EQUI ON FIELD SAMPLES**

Bartolomé Del Pino L.E. <sup>[2]</sup>, Cersini A. <sup>[1]</sup>, Scicluna M.T. <sup>[1]</sup>, Nardini R. <sup>[1]</sup>, Manna G. <sup>[1]</sup>, Antognetti V. <sup>[1]</sup>, Autorino G.L. <sup>[1]</sup>



## Metodi e risultati

### W.P.2: Algoritmo diagnostico

Step 2: Confronto tra tecniche sierologiche (ELISA IFAT),  
biomolecolari (PCR step 1) e di ricerca diretta (striscio ematico)  
(~1300 campioni di animali sintomatici e asintomatici)

	B.caballi		
Assay	Overall	Asymptomatic	Suspect cases
IFAT	0.13 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.07 <sup>a</sup>
ELISA	0.05 <sup>ab</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.03 <sup>ab</sup>
Commercial PCR	0.02 <sup>cd</sup>	0.02 <sup>b</sup>	0.06 <sup>c</sup>
Literature PCR	0.07 <sup>ce</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.04 <sup>d</sup>
Blood smear	0.07 <sup>bde</sup>	0.01	0.10 <sup>bcd</sup>





## Metodi e risultati

### W.P.2: Algoritmo diagnostico

Step 2: Confronto tra tecniche sierologiche (ELISA IFAT),  
biomolecolari (PCR step 1) e di ricerca diretta (striscio ematico)  
(~1300 campioni di animali sintomatici e asintomatici)

Assay	<i>T.equi</i>		
	Overall	Asymptomatic	Suspect cases
IFAT	0.42 <sup>1</sup>	0.05	0.32 <sup>1</sup>
ELISA	0.38 <sup>2</sup>	0.40 <sup>1</sup>	0.32 <sup>2</sup>
Commercial PCR	0.30 <sup>34</sup>	0.34 <sup>23</sup>	0.23 <sup>3</sup>
Literature PCR	0.58 <sup>35</sup>	0.64 <sup>2</sup>	0.34 <sup>4</sup>
Blood smear	0.07 <sup>1245</sup>	0.01 <sup>13</sup>	0.10 <sup>1234</sup>



## Metodi e risultati

### W.P.2: Algoritmo diagnostico

Step 2: Confronto tra tecniche sierologiche (ELISA IFAT), biomolecolari (PCR step 1) e di ricerca diretta (striscio ematico) (~1300 campioni di animali sintomatici e asintomatici)

		PCR		
		POSITIVE (Ct < 40)	NEGATIVE	INCONCLUSIVE (Ct ≥ 40)
SEROLOGICAL TEST(S)	POSITIVE	<p><b>Active Infection:</b> evaluate clinical and haemato-biochemical parameters for treatment.</p> <p><b>Previous/chronic infection:</b> repeat PCR 2x template.</p>	<p><b>Previous/chronic infection:</b> repeat 2x template.</p>	<p><b>Previous/chronic infection:</b> repeat PCR 2x template.</p>
	NEGATIVE	<p><b>Early infections:</b> monitore for seroconversion; evaluate clinical and haemato-biochemical parameters for treatment.</p>	<p><b>Free from infection</b></p>	<p><b>Suspect: repeat PCR 2x template.</b></p>





## Metodi e risultati

### W.P.2: Algoritmo diagnostico

Step 2: Confronto tra tecniche sierologiche (ELISA IFAT),  
biomolecolari (PCR step 1) e di ricerca diretta (striscio ematico)  
(~1300 campioni di animali sintomatici e asintomatici)



**047 Addition of PCR methods to conventional serology for the routine diagnosis of equine piroplasmosis**

*Maria Teresa Scicluna, Roberto Nardi, Leticia Elisa Bartolomé del Pino, Ida Ricci, Francesca Rosone, Gian Luca*



IEIDC X  
International Equine  
Infectious Diseases  
Conference

**191**

**Preliminary results on the inclusion of PCR for the diagnosis of equine piroplasmosis (EP)**

M.T. Scicluna<sup>1</sup>, R. Nardini<sup>1</sup>, L.E. Bartolomé Del Pino<sup>1,2</sup>, A. Cersini<sup>1</sup>, G. Manna<sup>1</sup>, G.L. Autorino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana, Rome, Italy; <sup>2</sup>Complutense University of Madrid, Spain





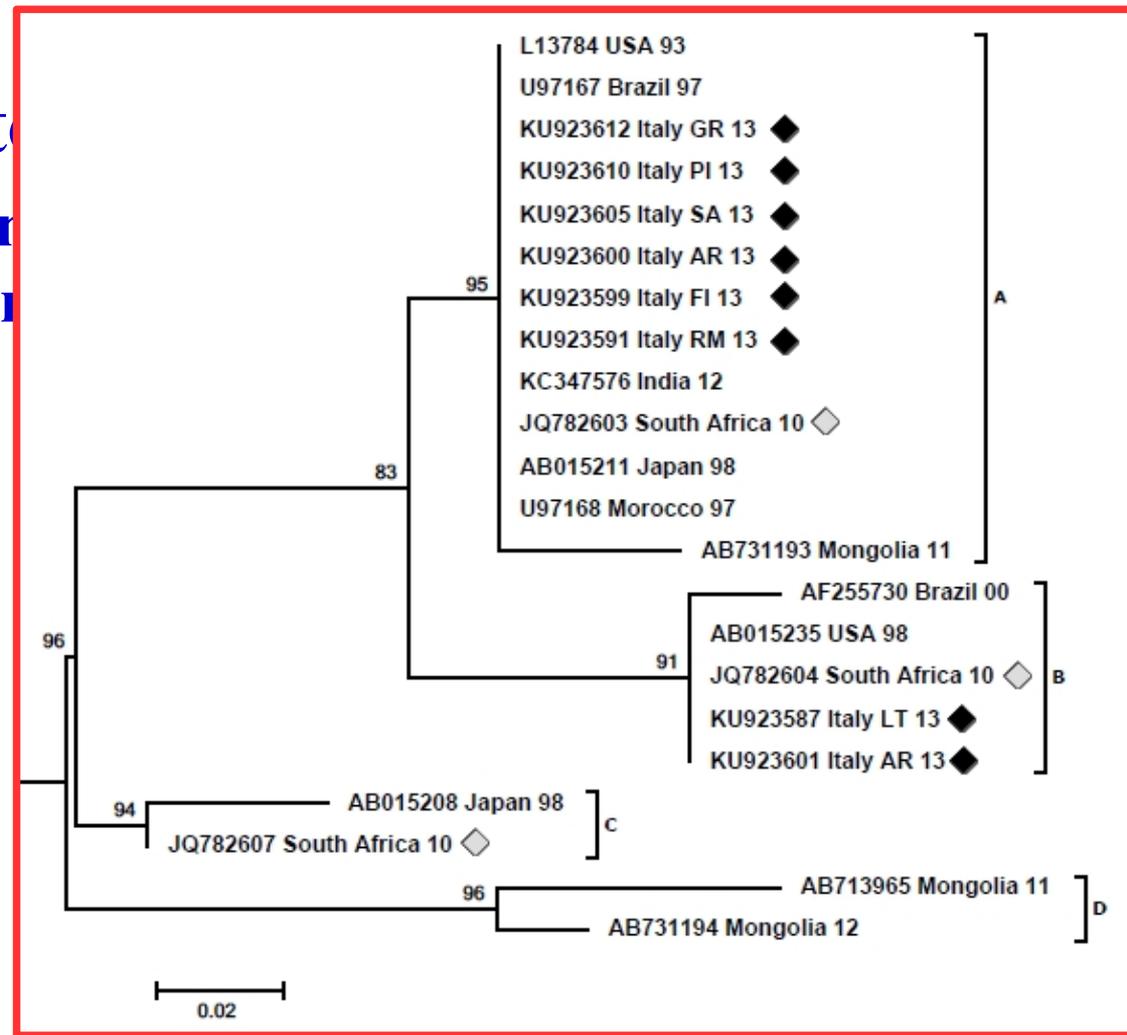
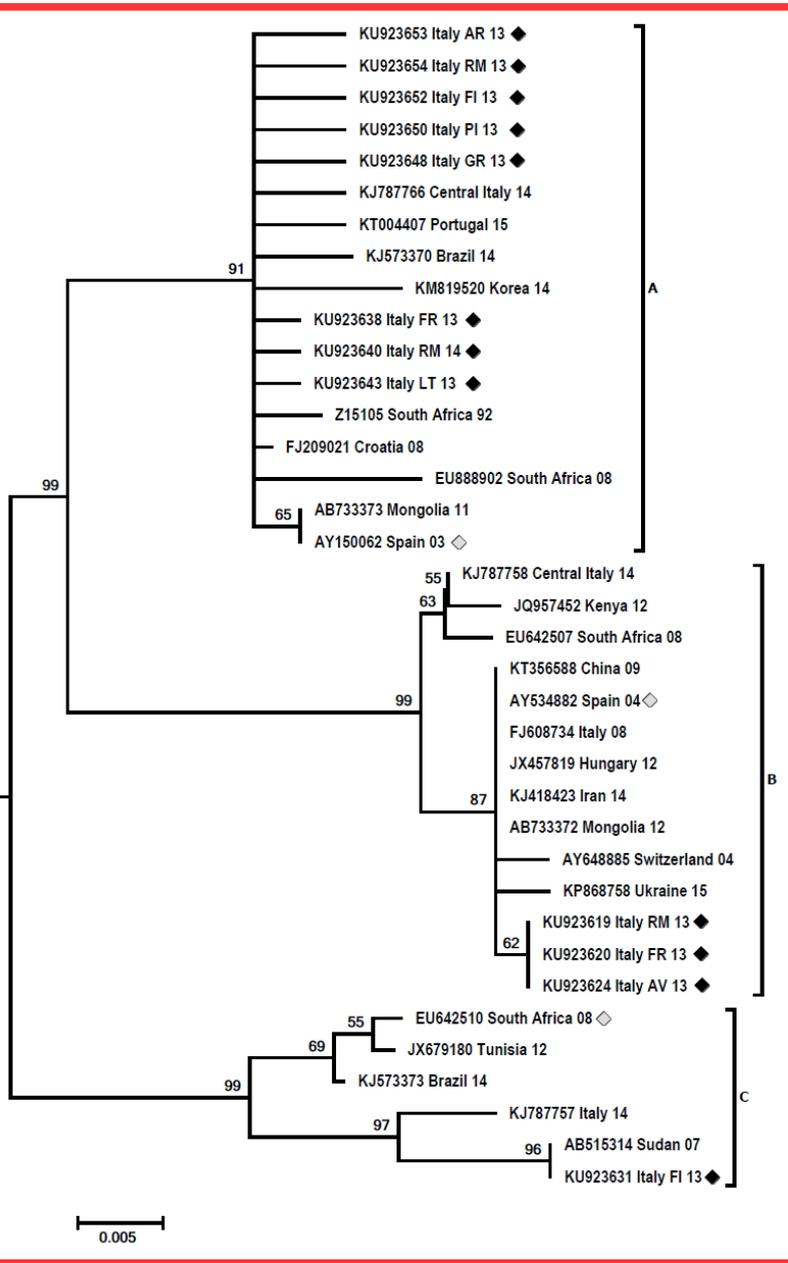
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Metodi e risultati

**W.P.2: Studio delle sequenze di stipiti parassitari in funzione dell'origine geografica di provenienza**

Sequenziamento di una frazione rappresentativa dei positivi rilevati







## Metodi e risultati

### W.P.2: Studio delle sequenze di stipiti parassitari in funzione dell'origine geografica di provenienza



**WAVLD 17**  
Saskatoon, Canada  
June 15-18, 2015

Poster 103

062 Preliminary observations on the genetic heterogeneity of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the horse population of central Italy

*Antonella Cersini, Maria Teresa Scicluna, Leticia Elisa Bartolomé del Pino, Roberto Nardini, Raffaella Conti, Giuseppe Manna, Gian Luca Autorino*



**187**  
**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**

A. Cersini<sup>1</sup>, LE Bartolomé Del Pino<sup>1,2</sup>, V. Antognetti<sup>1</sup>, R. Lorenzetti<sup>1</sup>, R. Nardini<sup>1</sup>, G.L. Autorino<sup>1</sup>, M.T. Scicluna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Rome, Italy;  
<sup>2</sup>Complutense University of Madrid, Spain

International Equine Infectious Diseases Conference





# Metodi e risultati

## W.P.3: Caso controllo

Definizione di caso sospetto di forma acuta: presenza di temperatura  $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$  (anche se intermittente) e almeno uno dei seguenti sintomi: anemia, ematuria, emorragie petecchiali, ittero.

Analisi: Anaplasma, Babesia, Theileria, Leptospira (sierologico e ricerca antigene), Anemia Infettiva Equina (sierologico), Striscio ematico periferico, AST, GGT, CPK, Bilirubina Totale e Diretta, Emocromo completo con formula, Proteine totali e Protidogramma.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Metodi e risultati

## W.P.3: Caso controllo

Criticità: sintomatologia riportata incerta, bias per ottenere analisi gratuite?

Analisi statistiche preliminari:

**NEI CASI CONFERMATI VS CONTROLLI**

**ALBUMINA, PIASTRINE E RAPPORTO A/G DIMINUISCONO**

**MONOCITI, BASOFILI, PROTEINE TOTALI, FRAZIONE**

**GAMMA AUMENTANO**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Metodi e risultati

## W.P.3: Caso controllo

Analisi statistiche preliminari:

**NEI CASI CONFERMATI VS SOSPETTI NON CONFERMATI  
(SINTOMI MA NON RILEVATI PIROPLASMI)**

**PIASTRINE DIMINUISCONO NEI CASI DI PIROPLASMOSI**





## Metodi e risultati

### W.P.3: Caso controllo

Analisi statistiche preliminari:

**NEI SOSPETTI NON CONFERMATI (SINTOMI MA NON RILEVATI PIROPLASMI) VS CONTROLLI**

PROTEINE TOTALI MONOCITI, GAMMA AUMENTANO  
GLOBULI BIANCHI, LINFOCITI, ALBUMINA, RAPPORTO  
A/G DIMINUISCONO

RISULTATI “PATOGNOMONICI” DI PIROPLASMOSI:

~~ALBUMINA, PIASTRINE E RAPPORTO A/G DIMINUISCONO~~  
~~MONOCITI, BASOFILI, PROTEINE TOTALI, FRAZIONE~~  
~~GAMMA AUMENTANO~~





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Trasferibilità e risvolti applicativi

- **Implementazione delle conoscenze,**  
utile ai fini di eventuali attività di  
informazione e formazione degli  
allevatori e dei veterinari.

*Giornata di Studio*

## **IL CALO DI RENDIMENTO DEL CAVALLO: PROBLEMI DI MANAGEMENT E DI ORIGINE INFETTIVA**



(The Link Yellow Horses, 1912 - Franz Marc)

**26 novembre 2016**

*Palazzo delle Federazioni Sportive Italiane,  
Sala Auditorium Viale Tiziano, 74 – Roma*



Biologi, tecnici di laboratorio e  
veterinari: **2,3 crediti**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## Trasferibilità e risvolti applicativi

- **Miglioramento del servizio diagnostico** rendendo più informativo il risultato integrato di sierologia ed analisi biomolecolari
- **Evidenziazione di criticità** diagnostiche (ELISA per *B. caballi*) ed successivi approfondimenti
- Punti di partenza per **nuove ricerche**: Caratterizzazione molecolare degli emoparassiti degli equidi e dei vettori.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie per  
l'attenzione

