

RICERCA CORRENTE 2010

REPORT FINALE Progetto IZSLT 02/10 RC

Valutazioni diagnostiche, patogenetiche ed epidemiologiche finalizzate all'acquisizione di elementi per l'analisi del rischio della diffusione dell'anemia infettiva equina

Area tematica: **Sanità animale**

linea di ricerca: Approfondimento dello studio sulla patogenesi dell'Anemia infettiva degli equidi con particolare riferimento alla persistenza dell'infezione nei soggetti sieropositivi anche in relazione alla loro capacità infettante nei confronti di equidi conviventi. Approfondimento dell'evoluzione epidemiologica dell'Anemia infettiva degli equidi attualmente attiva in Italia

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino

Struttura di appartenenza: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT), Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma

e-mail gianluca.autorino@izslt.it

Data scadenza del progetto: 14.12.2014

“ 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

Elenco dei collaboratori	3
Valutazione dei fattori di rischio che influenzano la persistenza di focolai e l'insorgenza di nuovi casi d'infezione da AIE sul territorio nazionale	6
Attività di indagine entomologica	6
Attività di ricerca virologica su soggetti risultati positivi nel corso delle attività di sorveglianza sierologica	8
Studio trasversale su muli positivi con diverso pattern sierologico ai fini della verifica quali/quantitativa dei titoli viremici anche per la valutazione del rispettivo rischio di trasmissione dell'infezione	10
Studi filogenetici e di epidemiologia molecolare del virus dell'AIE	26
Referenze	40
Divulgazione dei risultati della ricerca	48
Allegato 1	49

ELENCO DEI COLLABORATORI

1. Unità Operativa n.1/2

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

Gian Luca Autorino

Maria Teresa Scicluna

Collaboratori: Ida Ricci, Raffaele Frontoso, Francesca Rosone, Giuseppe Manna, Daniela Calciolo, Massimiliano Simula, Elena Canelli, Alessia Altigeri

Unità operativa n. 3

IZSLT Roma - Ufficio di staff Biotecnologie

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Raniero Lorenzetti

Collaboratori: Demetrio Amaddeo, Antonella Cersini, Ilaria Ciabatti, Maurizio Zini,

Unità operativa n. 4

IZSLT - Ufficio di Staff Osservatorio epidemiologico

Responsabile U.O.: dr. Marcello Sala

Collaboratori: Paola Scaramozzino, Sara Simeoni, Simonetta Lauro

Unità operativa n. 5

IZSLT, Sezione di Pisa

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Riccardo Forletta

Unità operativa n. 6

IZSLT – Laboratorio di Parassitologia

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa: Claudio Deliberato

Collaboratori: Adele Magliano

Unità operativa n. 7,

IZSLT - Sezione di Latina

Responsabile U.O. Renato Ugo Condoleo

Collaboratori: Giorgio Saralli

Unità operativa n. 8,

IZSLT – Sezione di Rieti

Responsabile U.O. Grifoni Goffredo

Collaboratori: Pietro Calderini

Unità operativa n. 9

Ministero della Salute – DGSA - Ufficio II

Responsabile U.O. Luigi Ruocco

Collaboratori: Mattia Paglialunga

Unità operativa n. 10

Ministero della Salute – DGSA - Ufficio VIII

Responsabile U.O. Luigi Presutti

Collaboratori: Francesco Battarino

Unità operativa n. 11

Università degli Studi di Perugia – Sezione di Scienze Sperimentali e Biotecnologie applicate
Responsabile U.O.: Mauro Coletti
Collaboratori: Fabrizio Passamonti

Unità operativa n. 12

Gluck Equine Research Center – Lexington, Kentucky
Responsabile U.O. Charles J. Issel
Collaboratori, Frank Cook

Unità operativa n. 13

IZSUM, Osservatorio Epidemiologico
Responsabile U.O. Carmen Maresca

Unità operativa n. 14

ASL Rieti . Servizio Veterinario
Responsabile U.O. Angelo Toni
Collaboratori Dino Cesare Lafiandra

Unità operativa n. 15

ASL Rieti . Servizio Veterinario
Responsabile U.O. Angelo Toni
Collaboratori Dino Cesare La fiandra

Unità operativa n. 16

Servizio Veterinario Azienda USL RM/G
Responsabile U.O. Gian Carlo Micarelli
Collaboratori Italo Caretta

Unità operativa n. 17

ASL Frosinone - Servizio Veterinario
Responsabile U.O. Antonio Messore
Collaboratori Antonio Lancia

Unità operativa n. 18

Servizio Veterinario Azienda ASL di Avezzano – Sulmona
Responsabile U.O. Mario Mazzetti

Unità operativa n. 19

IZS Mezzogiorno – sede di Portici
Responsabile scientifico dell'U.O. Giovanna Fusco

Unità operativa n. 20

IZSPB - sede di Foggia
Responsabile scientifico dell'U.O. Nicola Cavaliere

Valutazioni diagnostiche, patogenetiche ed epidemiologiche finalizzate all'acquisizione di elementi per l'analisi del rischio della diffusione dell'anemia infettiva equina

*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*

Autore: Gian Luca Autorino

N. identificativo progetto: IZSLT 02/10 RC

Responsabile Scientifico: Gian Luca Autorino

e-mail: gianluca.autorino@izslt.it

Obiettivi generali del progetto:

- acquisire informazioni per la valutazione della gestione dei focolai in termini di effettuazione delle indagini epidemiologiche previste ed adozione delle misure di biosicurezza e vigilanza
- verificare le possibili associazioni fra la persistenza dell'infezione e nuovi casi incidenti rispetto al metodo diagnostico impiegato per la sorveglianza e per gli accertamenti di cui al DM 1976 e DPR 243/94.
- effettuare indagini virologiche qualitative e quantitative su campioni prelevati da soggetti infetti.
- Valutare l'iter dei metodi analitici impiegati nella diagnosi e sorveglianza dell'AIE per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica.
- acquisire informazioni sull'epidemiologia e la patogenesi del virus dell'AIE al fine di effettuare un'analisi del rischio di diffusione dell'infezione.

Valutazione dei fattori di rischio che influenzano la persistenza di focolai e l'insorgenza di nuovi casi d'infezione da aie sul territorio nazionale

Sono state aggiornate le conoscenze inerenti gli aspetti diagnostici, patogenetici, filogenetici ed epidemiologici dell'AIE attraverso approfondite ricerche bibliografiche ed in banche dati e sono stati analizzati i dati e le informazioni ottenute dall'attuazione dei piani di sorveglianza a partire dal 2007 verificando l'effettivo numero di casi incidenti nelle aziende focolaio ed in quelle che avevano registrato positività negli anni precedenti.

La scheda epidemiologica messa a punto nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSLT 07/08 RC per la raccolta di informazioni per l'identificazione dei fattori di rischio è stata revisionata per eliminare le informazioni ridondanti e validata dopo somministrazione presso 62 aziende con soggetti positivi di differenti categorie situate in 12 regioni.

E' stata definita la base campionaria per la somministrazione del questionario ad aziende non infette ai fini dell'espletamento dello studio caso-controllo e l'analisi epidemiologica per l'individuazione delle variabili di rischio associate alla persistenza dei focolai e alla diffusione dell'infezione. Allo scopo, partendo dall'anagrafe degli allevamenti di equidi presenti in BDN, è stato selezionato secondo criteri di casualità un numero almeno doppio di allevamenti negativi, situati nelle aree delle province di Roma, Rieti, Latina, Frosinone e dell'Aquila in cui, nell'ambito delle attività di sorveglianza condotte negli anni precedenti, erano stati segnalati casi di anemia infettiva.

Nelle successive tabelle è riportato il numero di aziende visitate ripartito per provincia di origine.

Il criterio per la selezione delle aziende è stato il seguente:

Per ottenere il migliore approccio con gli allevatori, per la somministrazione della scheda, è stato incaricato un veterinario libero professionista operante nel settore, sottoposto a specifica formazione preliminare.

In allegato (1) viene riportata la scheda somministrata ai detentori di equidi che si compone di 6 sezioni ai fini della raccolta dei dati relativi a: stato sanitario dell'azienda, anamnesi aziendale, censimento, caratteristiche dell'azienda, tipologia del territorio, presenza ed abbondanza dei vettori, misure di biosicurezza aziendali, residenzialità degli equidi e movimentazioni degli stessi.

Attività di indagine entomologica

I principali vettori del virus dell'Anemia Infettiva Equina sono i ditteri della famiglia Tabanidae. Come in tutti i casi che coinvolgono vettori meccanici, la loro rilevanza epidemiologica nella circolazione del virus è oggetto di dibattito ed è considerata variabile a seconda dei casi e delle circostanze. Studi condotti negli Stati Uniti hanno dimostrato che aree a differente incidenza e prevalenza del virus sono caratterizzate da popolazioni di tabanidi differenti, per composizione specifica ed abbondanza. La trasmissione meccanica del virus dell'AIE da parte dei tabanidi è stata anche dimostrata in studi di laboratorio. In particolare, ricercatori americani hanno dimostrato che la trasmissione si può verificare in seguito ad un'unica puntura da parte di un tafano del genere *Tabanus*, genere che comprende specie di grandi dimensioni, i cui pezzi boccali possono essere contaminati con una quantità di sangue relativamente grandi. Nel nostro Paese studi sulle popolazioni di tafani in aree interessate da circolazione virale non sono mai stati effettuati, e non esistono pertanto dati storici in materia. Per questo motivo è sembrato interessante e rilevante, nell'ambito del presente progetto di ricerca, effettuare campionamenti di tafani in aree a circolazione virale in Italia centrale. L'attività entomologica ha avuto carattere di studio preliminare, soprattutto finalizzato alla messa a punto di adeguate tecniche di cattura, smistamento ed identificazione dei tabanidi.

Per quanto riguarda l'attività entomologica sul campo, è stata individuata un'area di studio in provincia di Rieti, recentemente interessata da circolazione virale, al cui interno sono state individuate due micro-aree, una ad alta ed una a bassa prevalenza del virus dell'AIE. A seguito di alcuni sopralluoghi presso strutture potenzialmente idonee (cioè con presenza di equini tenuti al pascolo esterno per tutto il periodo di campionamento), sono stati selezionati 2 siti di campionamento dei tafani:

- 1) Posta: 42°31'31,43"N – 13°06'22,64"E; 725 mslm. Bassa prevalenza AIE. Presenza di cavalli e bovini. Lungo una strada in prossimità del paese. Pascoli, spesso allagati, alternati a bosco. Nelle strette vicinanze di un corso d'acqua;
- 2) Vallemare (Frazione di Borbona): 42°28'56,43"N – 13°06'40,84"E; 1.035 mslm. Alta prevalenza AIE. Presenza di cavalli, asini, bovini e cani. Maneggio in una zona erbosa circondata da boschi.

Nel periodo giugno-ottobre dell'anno di ricerca, sono state effettuate catture con periodicità settimanale. In ciascun sito sono stati utilizzati contemporaneamente 2 tipi di trappola, Horse pal e H-trap, appositamente ideati per la cattura dei tafani. Durante ciascuna sessione di cattura, le trappole operavano per 48 ore consecutive, posizionate in prossimità degli animali in modo che risultassero ben visibili da ogni lato. Entrambi i modelli di trappola, infatti, sfruttano l'attrazione dei tafani nei confronti di oggetti scuri che staglino rispetto ad uno sfondo. In tutte e due le trappole, una palla nera appesa oscilla al minimo movimento dell'aria attirando i tafani; al momento di decollare dalla palla gli insetti finiscono in un meccanismo a nassa che li convoglia in un contenitore di raccolta. Alla fine della sessione di cattura il contenitore con i tafani era rimosso dalla trappola e portato in laboratorio. Per aumentare l'attrattività della trappola, è stato aggiunto un attrattivo odoroso costituito da una cartuccia di octenolo, sostanza naturalmente presente nell'urina di equini e bovini, che esercita un notevole potere attrattivo nei confronti dei ditteri ematofagi. All'arrivo in laboratorio il contenitore contenente gli insetti catturati veniva messo in congelatore a -20°C per la loro soppressione. Successivamente veniva effettuato uno smistamento del materiale catturato, selezionando i soli ditteri della famiglia Tabanidae, che venivano nuovamente congelati a -20°C fino alla loro identificazione. L'identificazione morfologica dei tafani è stata effettuata allo stereo-microscopio seguendo le chiavi analitiche di Chvala (The Horse Flies of Europe – Diptera, Tabanidae) e Portillo-Rubio (Fauna Iberica. Vol. 18. Diptera: Tabanidae).

In entrambi i siti di cattura sono stati catturati tafani durante tutto il periodo di campionamento. Le catture più abbondanti si sono rilevate nel sito di Posta. Sono state identificate 21 specie della famiglia Tabanidae, appartenenti a 6 generi. Il genere più rappresentato, con 13 specie, è risultato il genere *Tabanus*, dominante anche per quanto riguarda il numero di esemplari catturati (83.3% del totale). La specie dominante è risultata *Tabanus marianii*. Le trappole modello Horse pall sono risultate più efficaci delle H-Trap, sia come numero di esemplari che di specie catturate.

L'attività entomologica nell'ambito del presente progetto di ricerca era fondamentalmente finalizzata a valutare le tecniche di campionamento e di studio dei tafani, in assenza di dati in materia relativi all'area di studio e al nostro Paese in generale. Pur non avendo dati di ferimento, si può concludere che nelle aree oggetto di studio le popolazioni di tafani sono risultate abbondanti e con una notevole diversità di specie. In particolare, relativamente al genere *Tabanus*, considerato in letteratura il più rilevante dal punto di vista della trasmissione del virus dell'AIE, i dati mostrano che questo genere è risultato il più rappresentato sia come numero di esemplari (83.3% di quelli catturati) che di specie (13). Dunque il dato entomologico conferma in qualche modo quanto riportato in letteratura in lavori nord Americani, che indicano aree con una ricca fauna di ditteri del genere *Tabanus* come quelle a maggior rischio di circolazione dell'anemia infettiva equina, indicando la trasmissione da parte di vettori come il più probabile mezzo di diffusione del virus.

Le due trappole scelte per il campionamento, innescate anche con attrattivo odoroso, sono risultate efficaci nella cattura dei tafani, con numerosità che hanno superato i 1.500 esemplari per cattura. La

differente efficacia quantitativa tra i due modelli, molto simili per struttura e principio attrattivo, è probabilmente da imputarsi ad una diversa conformazione del meccanismo a nassa che convoglia i tafani nel contenitore di raccolta; nella Horse Pall infatti la nassa è fatta di rete, su cui gli insetti trovano un facile appiglio per camminare fin dentro il contenitore; nella H-Trap il cono che convoglia gli insetti è in materiale plastico liscio e durante le catture era possibile osservare che molti insetti scivolavano dalla superficie del cono non riuscendo ad entrare nel contenitore di raccolta. In generale, comunque, si può concludere che le trappole e le tecniche di cattura, smistamento ed identificazione impiegate siano idonee per gli scopi della ricerca e possano essere impiegate per future attività di campo sui tafani come vettori dell'AIE.

Attività di ricerca virologica su soggetti risultati positivi nel corso delle attività di sorveglianza sierologica

Assieme alle UUOO degli Istituti Zooprofilattici e delle ASL partecipanti al progetto, sono state definite le modalità di campionamento degli animali in vita e sui soggetti eventualmente soppressi per volontà dei proprietari per poter valutare la proporzione di soggetti con presenza di genoma virale nel sangue e la sensibilità diagnostica dei metodi disponibili sulle differenti matrici biologiche.

Per gli animali mantenuti in condizioni di isolamento, ai fini della ricerca del genoma virale dal plasma, veniva espressamente richiesto un prelievo di sangue intero, impiegando provette contenenti EDTA, in considerazione che altre tipologie di anticoagulante, quali il sodio citrato e l'eparina, risultano interferire con l'esecuzione dei test di PCR.

Presso mattatoi veniva invece richiesto, oltre al campione di sangue, anche un prelievo di aliquote di milza, polmone e fegato, considerati gli organi con maggiore concentrazione virale.

In ogni caso, considerata la rapida degradabilità del genoma virale, veniva raccomandata la tempestiva consegna dei prelievi ai laboratori più vicini per provvedere al trattamento dei campioni ed al congelamento delle aliquote d'organo.

Nel periodo 2008-2012, sono stati complessivamente sottoposti a prelievo 65 soggetti sieropositivi. La maggior parte dei campioni sono stati ottenuti dalle regioni centrali a motivo della maggiore prevalenza osservata nel corso della sorveglianza. Tuttavia, anche ai fini delle successive analisi filogenetiche, si è cercato di ottenere prelievi anche dalle altre differenti aree del territorio nazionale per verificare l'eventuale variabilità dei ceppi virali circolanti, pur consapevoli che ciò avrebbe potuto condizionare la qualità dei campioni ai fini dello studio.

Si rappresentano i risultati dei 27 soggetti sottoposti a studio in via preliminare, di cui 19 cavalli, 6 muli e 2 asini. I campioni provenivano da 13 differenti regioni (Abruzzo, Basilicata, Calabria, Campania, Emilia Romagna, Lazio, Lombardia, Piemonte, Puglia, Sicilia, Toscana, Veneto ed Umbria). A tutti gli animali è stato prelevato il sangue, mentre gli organi erano disponibili per soli 10 soggetti.

Per aumentare la sensibilità diagnostica ai fini della la ricerca del DNA provirale, le differenti matrici prelevate ai soggetti sono state quindi sottoposte ad esame utilizzando i due differenti protocolli di PCR riportati in letteratura che abbiamo riscontrato maggiormente sensibili ai fini della ricerca del genoma dei ceppi virali circolanti (Cappelli K. et al., 2011, Journal of Clinical Microbiology. Dong JB et al 2012, Arch. Virol.).

Per verificare la specificità delle reazioni positive gli amplificati delle in PCR sono stati sottoposti a sequenziamento.

Si riportano in tabella i risultati degli esami condotti sui campioni appartenenti ai primi 27 soggetti sottoposti a controllo.

Anno riferimento	Soggetti controllati	Positività Plasma	Positività Organi	Organi positivo Plasma negativo	Totale Soggetti positivi
2008	5	1/5	3/4	3/4	4/5
2009	5	4/5	2/2	1/2	5/5
2010	1	-/1	-/-	-	-/1
2011	12	-/12	1/3	1/1	1/12
2012	4	-/4	-/1	-	-/4
Totale	27	5/27 (18%)	6/10 (60%)	5/7	10/27 (37%)

Complessivamente è stata ottenuta una positività in PCR nel 37% dei soggetti controllati (10/27). La specificità delle sequenze ottenute sui prodotti di amplificazione delle PCR ha confermato la positività delle reazioni ottenute.

Il dato complessivo deve essere considerato notevolmente sottostimato, tenuto conto che è stato possibile esaminare solo un numero limitato di organi (10 soggetti) e che la proporzione dei risultati positivi degli esami eseguiti su questi è tripla rispetto a quella ottenuta mediante ricerca del DNA provirale dal plasma.

In precedenti studi da noi condotti in condizioni controllate, ovvero su campioni di sangue direttamente prelevati e direttamente sottoposti ad esame, avevano dimostrato una buona sensibilità analitica dei saggi PCR impiegati, considerato che il DNA provirale è integrato al genoma dei monociti circolanti degli animali infetti. E' quindi verosimile che i dati contrastanti fra sangue ed organi siano effettivamente da attribuire a problemi di conservazione dei campioni della matrice sangue (non congelabile "tout court" senza preventivo trattamento), piuttosto che ad assenza di genoma o a modesta sensibilità analitica dei saggi impiegati.

L'analisi della provenienza dei campioni conferma indirettamente quanto ipotizzato circa le discordanze osservate: dei 7 soggetti con risultato plasma negativo/organi positivi, 5 non erano stati direttamente prelevati dalla UO2 in provincia di Roma, ma da Sezioni/ASL con conseguenti ritardi nel trattamento/consegna al laboratorio e, dei 17 soggetti completamente negativi (17 plasma + 4 organi), 14 (82%) erano stati inviati da altre province del Lazio e, per la maggior parte da altre regioni.

Alla luce di tali osservazioni, risulta ancora più impraticabile la ricerca diretta dell'RNA virale, considerata la maggiore degradabilità della molecola nelle condizioni di campo non sperimentali.

Dallo studio condotto si può concludere che il numero di soggetti con DNA provirale circolante è comunque elevato e, proprio perché ampiamente sottostimato, il loro mantenimento può costituire un importante fattore di rischio per il mantenimento e la diffusione dell'infezione nell'ambito della popolazione equina.

Come verrà più avanti rappresentato nella parte relativa allo studio filogenetici dei ceppi circolanti, l'impiego combinato dei due saggi molecolari per la ricerca del DNA provirale, selezionati fra quelli disponibili in letteratura, risulta aver aumentato notevolmente la sensibilità del metodo, rispetto ai precedenti anni, essendo stato possibile accertare la circolazione sul nostro territorio di ceppi virali di diversa origine. Tuttavia, oltre alle problematiche di idoneità del campione in grado, come visto, di influenzarne notevolmente l'efficienza, anche la laboriosità rende impossibile al momento la sostituzione degli stessi ai metodi sierologici ai fini della sorveglianza.

Al contrario, potrebbero trovare utile impiego, se integrati alla ricerca sierologica, soprattutto nei focolai d'infezione, potendo rilevare più precocemente rispetto a questi ultimi, eventuali casi incidenti.

Studio trasversale su muli positivi con diverso pattern sierologico ai fini della verifica quali/quantitativa dei titoli viremici anche per la valutazione del rispettivo rischio di trasmissione dell'infezione

Nel corso della precedente ricerca corrente (IZSLT 07/08 RC) avevamo condotto uno studio sulla risposta clinica, sierologica ed ematologica in muli positivi per AIE a seguito di riattivazione dell'infezione.

La prova condotta su 10 muli naturalmente infetti aveva messo in evidenza che:

- A seguito di riattivazione 7 animali avevano mostrato febbre e trombocitopenia, mentre altri sintomi clinici per i quali gli animali sono stati monitorati sono stati modesti o inapparenti;
- Sei animali avevano mostrato incrementi di reattività sierologica; di questi, 2 nei confronti di uno solo fra i metodi impiegati, mentre nei rimanenti 4 la sieroconversione è risultata evidente con tutti i tre metodi utilizzati. Sebbene i tre metodi abbiano la p26 come denominatore comune, l'aumento di reattività nei confronti di questa proteina è risultato più evidente e marcato in Elisa ed Agid, piuttosto che in IB, metodo quest'ultimo riconosciuto come maggiormente sensibile rispetto agli altri (Issel, C.J. *et. al.*, 1988);
- Nel confrontare la risposta clinica rispetto ai risultati sierologici, si era osservato che fra gli 8 soggetti con febbre e trombocitopenia solo i 4 era evidente un aumento della reattività sierologica, dimostrando una assenza di correlazione fra le due situazioni;

La parte del presente progetto che di seguito si descrive ha quindi riguardato le ricerche condotte sui campioni prelevati nel corso del follow up per valutare la concentrazione di virus ai fini della valutazione del rischio biologico costituito da tali soggetti, con differente pattern sierologico, nel corso delle fasi di infezione cronica/inapparente ed acuta/viremica.

Analisi virologica

Stima della carica virale plasma associata

Il plasma raccolto durante il periodo di osservazione è stato esaminato per stimare la carica viremica (vRNA) plasma associata, usando una Real-time PCR quantitativa (qRT-PCR) come descritto di seguito, diretta per una regione del gene tat dell'esone 1 del virus AIE. Il RNA totale è stato estratto da un volume di plasma pari a 140 µl utilizzando il kit QIAamp1 Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) come riportato dalle indicazioni del produttore ed impiegando un estrattore automatico QIAcube[®]. Il RNA è stato estratto in doppio da ciascun campione e la sua concentrazione è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro.

Il RNA estratto è stato utilizzato subito oppure conservato a -80 °C fino agli esami successivi.

La trascrizione inversa è stata effettuata utilizzando un High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 200 ng del RNA estratto contenuto in un volume di 30 µl, con l'aggiunta dei seguenti reagenti: 6 µl di 10X random hexamer primers, 6 µl 10X RT-Buffer, 2.4 µl dNTP mix 100 mM, 3 µl of 5 U Multi Scribe Reverse Transcriptase e 12.6 µl di H₂O-DEPC ottenendo un volume totale di mix di reazione uguale a 60 µl. La sintesi del cDNA è stata eseguita utilizzando un termociclatore a 96 pozzetti - AB Veriti 96 well ThermalCycler (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) con il seguente ciclo termico: 25 °C per 10 min, 37 °C per 120 min, 85 °C for 5 min. I primers e la sonda per la qRT-PCR sono stati disegnati in collaborazioni con il Dr. F.R. Cook (Gluck Center, KY, USA), sulla sequenza altamente conservata della regione dell'esone 1 del gene tat del genoma virale, attraverso l'allineamento delle sequenze del virus AIE pubblicate in GenBank (Accession Numbers: AB008197, AF327877, AF033820, JX480631, JX480632, JX480633, JX480634), amplificando una regione di 119 bp. La posizione e la sequenza

dei primers e delle sonda sono le seguenti e sono riferite ai ceppi di AIE britannici EIAVuk strain – GenBank no. AF016316: MkIII Forward: 50-GGC GCC CGA ACA GGG ACC-30 (EIAVuk position number, 310–327). MkIII Reverse: 50-TGG CCA GGA ACA CCT CCA GAA GAC-30 (EIAVuk position number, 405–428). La sonda è la seguente EIAV (LNA) Fluorescent:50-FAM-T[+G]A ACC T[+G]G [+C]TG ATC G[+T]AG[+G]A-30BHQ 1 (EIAV uk position number, 353–373).

Per la PCR quantitativa è stato utilizzato un kit TaqMan® Universal PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con la seguente composizione: 12.5 µl of TaqMan®2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 900 nM of forward primer, 900 nM of reverse primer, 300 nM di sonda, 5 µl di cDNA e H2O-DEPC per ottenere un volume totale di 25 µl. La qRT-PCR è stata effettuata utilizzando un AB 7900HT Fast Real-Time PCR System con il seguente ciclo termico: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, e 50 cicli a 95 °C per 15 s, 52 °C per 30 s e 60 °C per 1 min. In ciascun ciclo di qRT-PCR un controllo interno opportunamente quantificato, sviluppato come descritto di seguito, è stato incluso per stimare la carica virale come copie di RNA/ml di campione di plasma.

Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando un ABI 7900HT Sequence Detection Systems software package ver. 2.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Messa a punto del controllo interno per la qRT-PCR

I prodotti della RT-PCR relativi alla coppia di primer del virus AIE MkIII, ottenuti dal mulo n° 4, sono stati purificati utilizzando il QIAquick® PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) e sono stati clonati in pCRII-TOPO vector-TOPO TA Cloning® Dual Promoter kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Per trasformare le cellule competenti ONE SHOT TOP 10 è stata utilizzata una reazione di legame (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguendo le indicazioni fornite dal produttore. La presenza dei prodotti della PCR clonati è stata verificata attraverso il sequenziamento del plasmide utilizzando sia la coppia di primers EIAV MkIII, sia dei primers interni al vettore pCRII-TOPO. Il DNA plasmidico utilizzato per la trascrizione in vitro è stato purificato con il kit Nucleo Spin Plasmid kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), linearizzato con il clivaggio mediante l'enzima di restrizione EcoRV e la concentrazione è stata misurata con spettrofotometro (Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). La trascrizione in vitro è stata effettuata con il kit MEGA Script1T7/Sp6 kit (Ambion, Austin, Texas, USA), seguendo le indicazioni del produttore, utilizzando come stampo un 1 mg del DNA plasmidico linearizzato. Il RNA trascritto in vitro è stato trattato con 2 U di DNase I (Ambion, Austin, Texas, USA) per 6 h a 37 °C. Successivamente all'inattivazione il RNA è stato purificato con aggiunta di acetato di ammonio e di etanolo e la mix è stata incubata per 30 min a 20 °C.

Il numero di molecole di RNA è stato calcolato sulla base della concentrazione del RNA misurata utilizzando lo spettrofotometro e, fino al suo impiego il pellet, risospeso in H2O-DEPC, è stato conservato a –80 °C in un volume di 5 µl da impiegare una sola volta.

Il limite di rilevamento (LOD) è stato determinato utilizzando il RNA trascritto in vitro e generato con i primers del virus AIE (EIAV MkIII), diluendo in base log10 aliquote del RNA per coprire un range di diluizioni tra $3,77 \times 10^9$ fino a 1 copia/µl di RNA. Il test per il LOD è stato effettuato in tre repliche indipendenti e il valore di Ct (ciclo soglia - threshold cycle) è stato usato per la costruzione della curva standard. La soglia limite è stata settata nella fase esponenziale della reazione e il valore Ct più alto di 45 è stato considerato negativo.

La curva standard è stata ottenuta dalla retta di regressione lineare attraverso i punti della curva dei Ct rispetto al logaritmo della concentrazione del controllo interno standard.

La quantità di RNA nei campioni sconosciuti è stata ottenuta interpolando la curva standard con i valori di Ct ottenuti per ciascun campione e corretta per ottenere il numero di copie per ml di plasma. Il valore di Ct per ciascun campione è stato calcolato come media dei valori ottenuti esaminando ciascun campione estratto due volte.

Sequenziamento dei amplificati ottenuti alla nested-PCR

Il sequenziamento preliminare è stato effettuato su di una regione di 313 bp del gene gag del DNA provirale estratto dai leucociti al momento del reclutamento degli animali impiegando una nested PCR come descritto da Cappelli e al. (2011), alla quale sono state apportate modeste modifiche. Il DNA genomico è stato estratto dai leucociti utilizzando un kit QIAamp[®] DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni del produttore. I primers utilizzati per la nested-PCR sono stati quelli riportati da Cappelli et al. (2011) che li aveva disegnati utilizzando gli allineamenti dei virus dell'AIE isolati in Asia, Nord America e Europa. Le mix delle due PCR sono state preparate utilizzando Platinum[®] Pfx DNA Polymerase kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). La master mix per la PCR 1 e 2 è stata composta da 5 µl di 10X Buffer, 0.5 mM di dNTPs, 2 mM MgSO₄, 0.025 U/ml della Platinum[®] Pfx DNA Polymerase (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e H₂O-DEPC per un volume totale di 50 µl.

Per il primo ciclo di PCR sono stati usati 0.2 mM del primer senso (EIAV DNA ITA F 50-GAATGGAGCAAAGCGCTCA-30), 0.2 mM del primers antisenso (EIAV DNA ITA R 50-CTGCCAGGCACCACATCTA-30) e 5 µl del cDNA mentre per il secondo ciclo di PCR sono stati utilizzati 0.2 mM del primer senso (EIAV DNA ITA NSTD F 50-TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG-30) e 0.2 mM del primer antisenso (EIAV DNA ITA NSTD R 50-TTTCTGTTTCCAGCCCCATC-30) e 5 µl del prodotto della prima PCR. L'amplificazione è stata effettuata utilizzando gene Amp[®]PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e il profilo termico utilizzato sia per la prima che per la seconda è stato il seguente: 94 °C per 10 min; 35 cicli per 94 °C per 15 s (PCR1)/20 s (PCR2), 52 °C per 30 s, 72 °C per 40 s (PCR1)/30 s (PCR2) ed una estensione finale a 72 °C per 10 min. La lunghezza delle sequenze amplificate è stata rispettivamente di 547 bp per la PCR1 e di 313 bp per la PCR2.

Successivamente i prodotti della nested-PCR sono stati purificati, utilizzando il kit QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), quindi sequenziati utilizzando la coppia dei primers interni della nested-PCR ed il kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit, version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con un sequenziatore automatico (ABI PRISM1 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le sequenze nucleotidiche sono state comparate con quelle pubblicate in GenBank con l'ausilio del software Nucleotide Blast (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Risposta sierologica

Le tabelle 6 e 7 riportano i risultati dei test sierologici, rispettivamente eseguiti mediante AGID e C-ELISA sul sangue prelevato con cadenza settimanale ai soggetti in esame, a partire dalla settimana precedente il trattamento IS.

Ai fini dell'espressione quantitativa dei risultati per l'AGID è stato assegnato un punteggio in ordine al tipo di reazione valutata secondo i criteri indicati in precedenza (figura 1A); per la C-ELISA sono indicate le positività dei sieri diluiti per raddoppio partendo da due separate diluizioni di 1/4 e 1/6.

I risultati degli esami sierologici al test AGID sono stati classificati facendo la somma dei punteggi ottenuti nel periodo di riferimento. Per la C-ELISA il punteggio complessivo viene definito sulla

base della somma del reciproco della diluizione in cui sieri hanno fornito esito positivo in occasione degli stessi prelievi.

Sulla base dei livelli di reattività osservati, sostanzialmente in accordo rispetto ad entrambi i metodi impiegati, i soggetti in studio sono stati raggruppati in due cluster. Il primo, ad alta reattività, definito come gruppo P che include i muli 1, 2, 4, 9 e 10; il secondo, a bassa reattività (gruppo N), che include i soggetti n. 3, 5, 6, 7 e 8.

Come già detto, gli stessi soggetti si trovano collocati negli stessi gruppi, indipendentemente dai risultati ottenuti con l'impiego dei due metodi, dimostrando quindi una sostanziale correlazione, pur in presenza di sensibilità analitiche differenti.

Inoltre, i soggetti inclusi nel gruppo N corrispondono a quelli che risultavano negativi al test AGID già in occasione del prelievo effettuato al momento dell'arruolamento per lo studio.

A seguito del trattamento IS non sono state osservate sier conversionsi significative al test AGID. In particolare, nel corso del periodo di osservazione, i muli 3 e 6 del gruppo N si sono mantenuti negativi ed il mulo 8 ha mostrato positività al limite della rilevabilità (score 1); nel mulo 7 la positività (score 1) si alternava a reazioni negative. Solo il mulo 5 ha mostrato un aumento della reattività passando da uno score 1 a 2 a partire dal ventottesimo giorno (tabella 6).

Nel gruppo P, un aumento più evidente della reattività al test AGID è stata osservata nei muli 9 e 10 (tabella 7).

Al test ELISA, le sier conversionsi nei soggetti che hanno presentato anche un aumento della reattività in immunodiffusione si sono confermate, risultando più evidenti in virtù della maggiore sensibilità del metodo e, in particolare (tabella 7) nel gruppo N il titolo del mulo 5 è incrementato di 16 volte, più modesto l'aumento osservato nel mulo 7 (4-8 volte). Di interesse la costante negatività anche al test ELISA del mulo n. 6 per l'intero periodo di controllo, nonostante il soggetto fosse risultato positivo circa due mesi prima, al momento del suo arruolamento presso l'azienda d'origine.

Nel gruppo P, i titoli si sono mantenuti stabili nei muli 1, 2 e 4, mentre, nei sieri dei muli 9 e 10 le sier conversionsi osservate erano rispettivamente pari a 24 e 3 volte, rispetto ai titoli di partenza.

Tabella 6: Esiti esami al test AGID espressi in score nei 10 Muli

	3	6	7	8	5	1	9	2	4	10
-7	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3
0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3
7	0	0	1	1	1	2	2	3	3	2
14	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3
21	0	0	1	1	1	2	4	3	3	4
28	0	0	1	1	2	2	4	3	3	4

Σ ↓

0	0	4	6	7	12	16	18	18	19
---	---	---	---	---	----	----	----	----	----

Tabella 7: Esiti esami al test ELISA espressi come reciproco della più alta diluizione ancora positiva nei 10 Muli

	6	3	7	8	5	1	2	9	10	4
-7	0	0	6	48	12	48	192	24	192	576
0	0	6	6	24	12	192	192	48	192	576
7	0	6	0	12	12	48	192	48	192	576
14	0	0	6	12	12	48	192	0	192	384
21	0	12	12	48	12	48	192	576	576	192
28	0	12	48	48	192	48	192	576	576	192

Σ ↓

0	36	78	192	252	432	1152	1272	1920	2496
---	----	----	-----	-----	-----	------	------	------	------

Al test di IB, alla diluizione di 1/20 non era possibile apprezzare, nei sieri degli animali di entrambi i gruppi, alcuna differenza di reattività nei confronti delle tre proteine strutturali del virus (p26, gp45 e gp90), né prima del trattamento IS, né al termine del periodo di osservazione. Tuttavia, a diluizioni superiori (1/80), nei sieri dei mulo n. 6, 7 e 8 prelevati in corrispondenza del termine del periodo di follow-up era più evidente un aumento della reattività nei confronti della gp45 (figura 3A,B,C). Tale riscontro sarebbe correlato ad un aumento della replicazione virale.

Da considerare il fatto che i tre soggetti in questione, sulla base dei risultati delle prove in AGID ed ELISA, erano tutti stati classificati all'interno del gruppo N e, fra questi, solo il n. 7 aveva sierconvertito al test C-ELISA. In analogia, la reattività in IB del siero di questo mulo aumentava anche nei confronti della p26 del virus dell'AIE, che, come detto in premessa, corrisponde alla stessa frazione antigenica impiegata nel test immunoenzimatico in uso presso il CRAIE.

Figura 3 A: esiti al test IB mulo 6 – sieri esaminati alla diluizione 1/80.

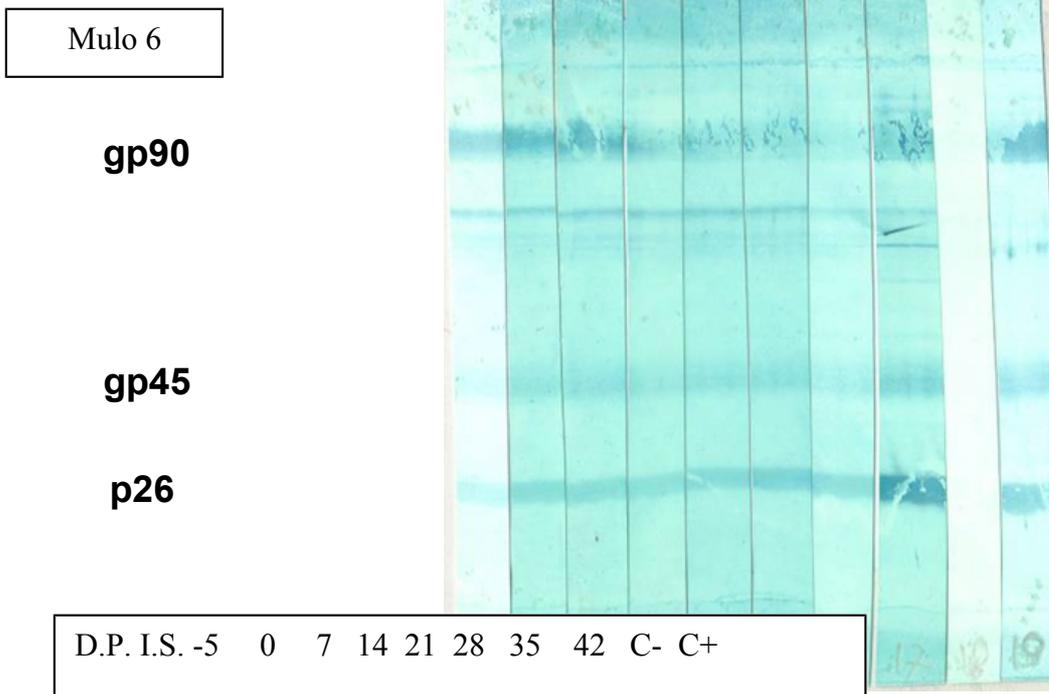


Figura 3 B: esiti al test IB mulo 7 – sieri esaminati alla diluizione 1/80.

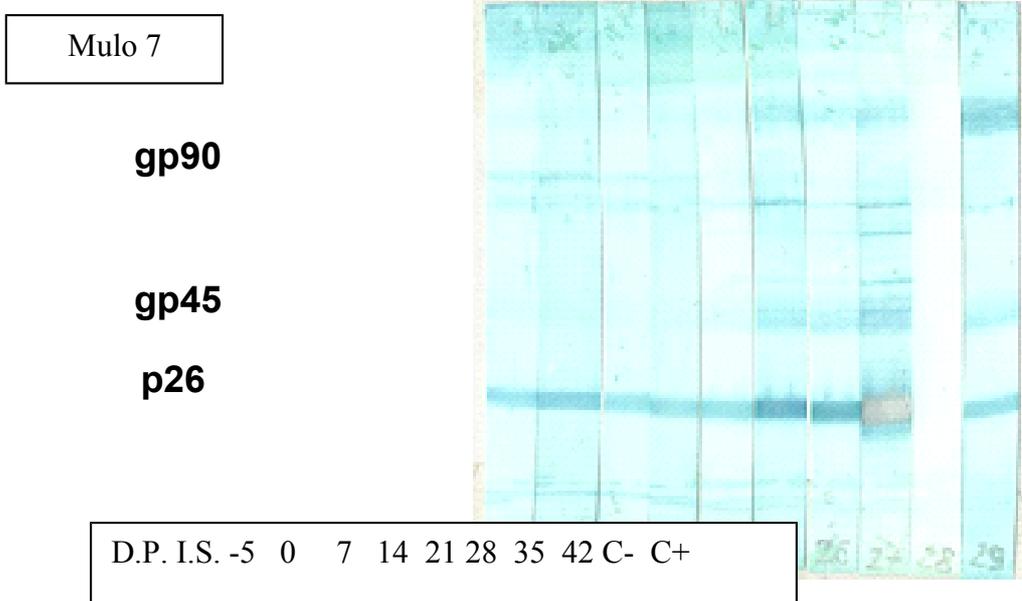


Figura 3 C: esiti al test IB mulo 8 – sieri esaminati alla diluizione 1/80.

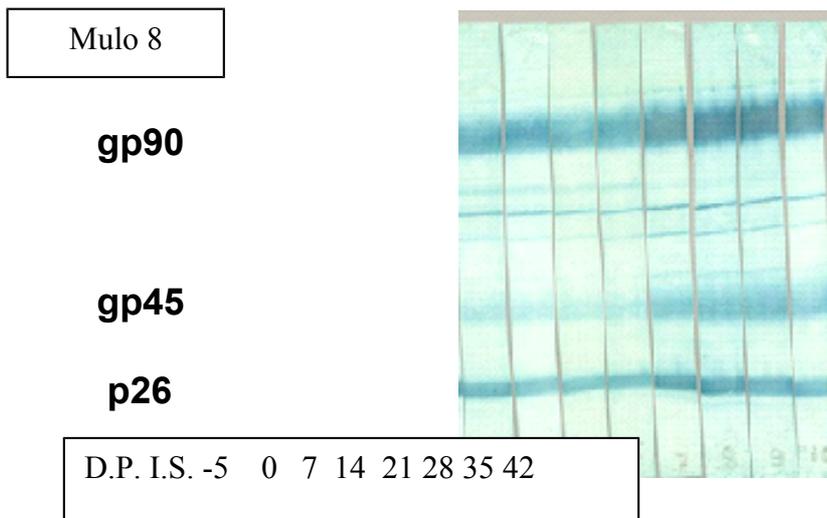


Figura 3 D: esiti al test IB mulo 9 – sieri esaminati alla diluizione 1/80

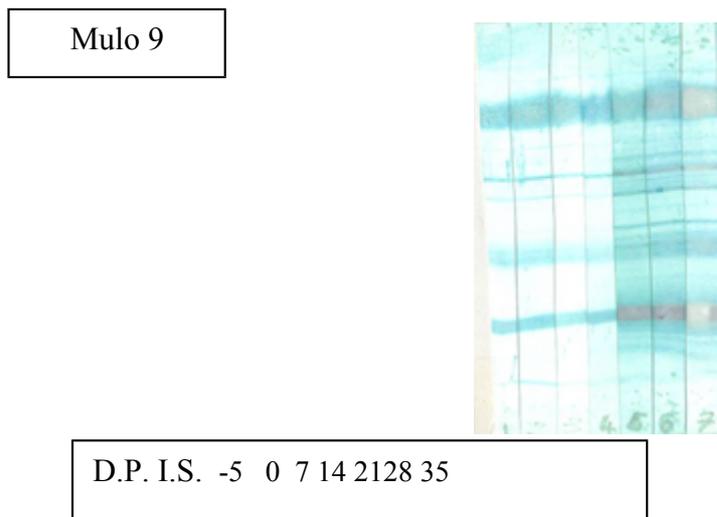
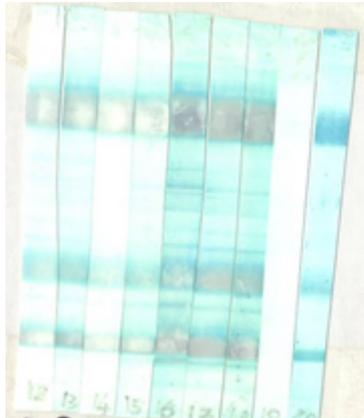


Figura 3 E: esiti al test IB mulo 10 – sieri esaminati alla diluizione 1/80

Mulo 10



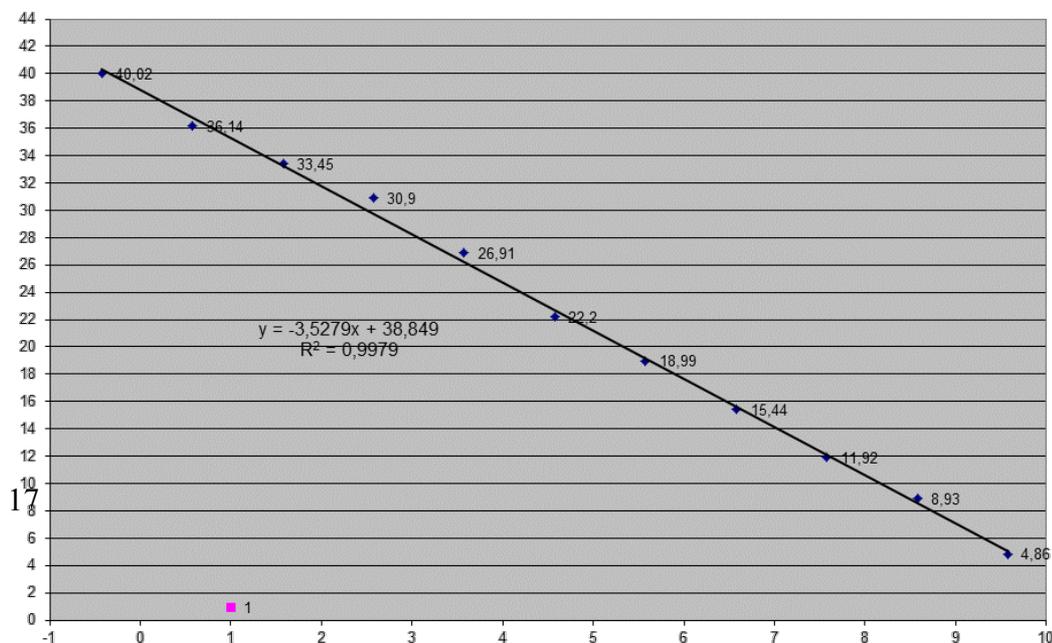
D.P. I.S. -5 0 7 14 21 28 35 C- C+

Stima della carica virale mediante RT-PCR quantitativa

La curva standard ottenuta utilizzando diluizioni seriali in base 10 del DNA trascritto del virus AIE è stata lineare (valore del coefficiente di regressione uguale a 0.9932) con un intervallo che variava da 10^9 per Ct = 4,86 a 0,4 molecole per Ct = 40.02 per 50 µl (grafico 8).

In particolare è stata osservata una relazione lineare tra le diluizioni dello standard ed i valori di Ct con un quadrato del coefficiente di correlazione intorno a 0,99, indice di un buon funzionamento dei primers selezionati. L'efficienza del test è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ dove lo slope è pari a -3,5279 ed è risultata essere del 92%. L'efficienza del test è stata confermata utilizzando l'RNA sintetizzato in vitro relativo all'esone 1 del gene tat.

Grafico 8: relazione lineare tra le diluizioni dello standard ed i valori di Ct



Le curve standard, prodotte con lo stesso trascritto del virus AIE derivato dal RNA, sono state usate ai fini della determinazione quantitativa (vRNA loads) nei campioni prelevati nel periodo di osservazione precedente e successivo all'IS. La sintesi dei risultati dei saggi di qRT-PCR condotti sui campioni di plasma è riportata nella tabella 8, mentre i grafici 9 e 10 mostrano l'andamento temporale dei vRNA loads osservati rispettivamente nel gruppo N e P.

Ad eccezione dei muli 6, 7 e 8, in tutti i rimanenti soggetti è stato rilevato RNA virale plasma associato in uno o più campioni prelevati precedentemente al trattamento con desametazone, indipendentemente dal gruppo di classificazione assegnato sulla base dei risultati sierologici. In particolare, il rilevamento di RNA virale nei muli 3 e 5, che presentavano una reattività al test di AGID molto debole o assente, non è stato episodico, ma ripetuto, raggiungendo e talvolta superando il numero di copie osservato prima del trattamento IS di alcuni animali del gruppo P (muli 1, 2 e 10), e il numero di copie degli altri soggetti dello stesso gruppo di appartenenza rilevate anche nel periodo di osservazione successivo al cinquantaseiesimo giorno.

In alcuni animali, indipendentemente dal gruppo di assegnazione (muli 1, 2, 4 e 10/P, e 3, 5/N), la variazione dell'RNA circolante è stata considerevole, anche prima dell'IS con titoli particolarmente elevati, pari a 6 e 5.48 log₁₀, rispettivamente nei muli 1 e 5. In particolare, il picco di RNA plasma associato del mulo 1 osservato in corrispondenza del settimo giorno precedente l'IS, è superiore rispetto a quello farmacologicamente indotto (14 giorno PIS).

In generale, a seguito di immunosoppressione è stata osservata un incremento del vRNA circolante, soprattutto in termini di durata temporale (tra il 9 - 19 giorno), con variazioni quantitative di range fino a 4.48 log₁₀ (tabella 8). In ogni caso non esiste alcuna relazione fra le differenze individuali in termini di concentrazione di vRNA plasma associato, e reattività ai test sierologici di immunodiffusione ed immunoenzimatico.

A titolo di esempio, la reattività al test ELISA nel mulo 9 è aumentata di 12–24 volte al 21 giorno dal trattamento IS mentre il picco di RNA virale non ha superato i 3 log₁₀ (tabella 7 e grafico 10). Per contro, la risposta sierologica successiva al trattamento IS nel mulo 1 è rimasta invariata mentre il titolo RNA virale plasma associata è stato di 3 log₁₀ superiore a quello registrato nel mulo 9 (Tabella 7 e 8).

Grafico 9: Evoluzione temporale della carica RNA virale plasma associata nel gruppo N (Muli 3, 5, 6, 7 e 8). La carica di RNA virale è riportata come copie \log_{10}/ml di plasma per ciascun animale e si riferisce ai giorni di campionamenti effettuati prima e dopo trattamento IS.

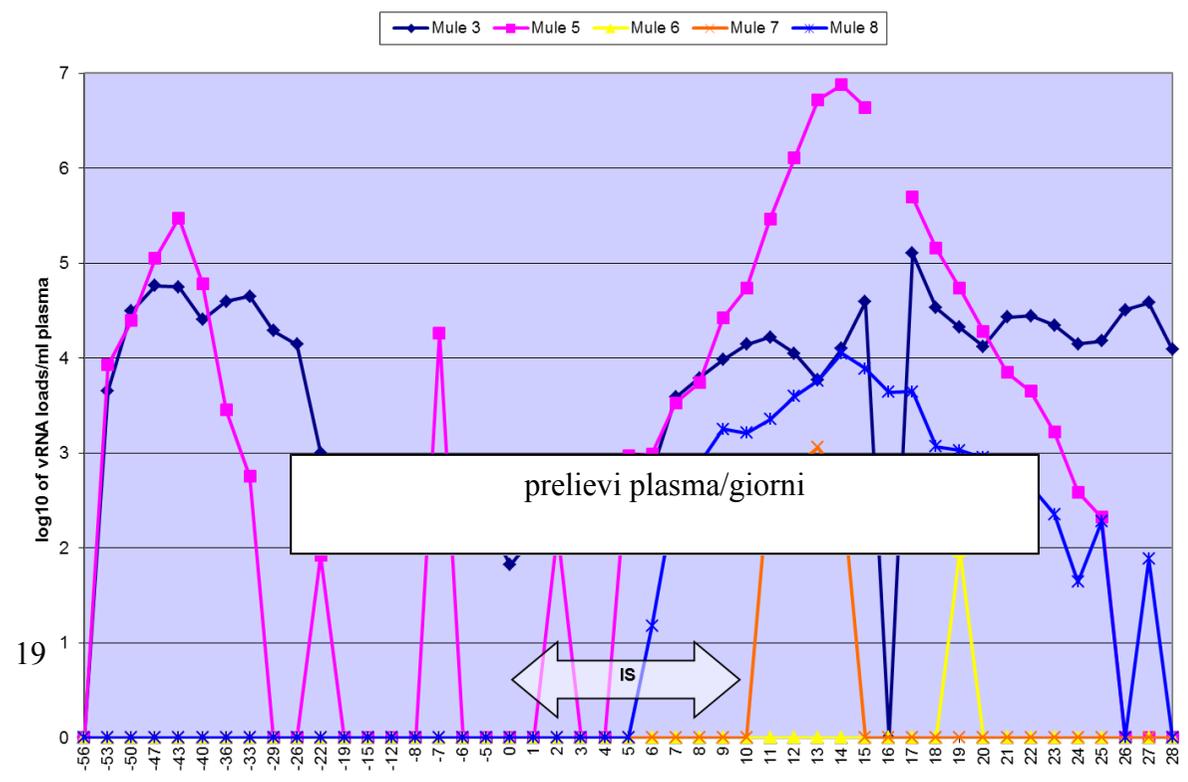


Grafico 10: Evoluzione temporale della carica RNA virale plasma associata nel gruppo P (Muli 1, 2, 4, 9 e 10). La carica di RNA virale è riportata come copie \log_{10}/ml di plasma per ciascun animale e si riferisce ai giorni di campionamenti effettuati prima e dopo trattamento IS.

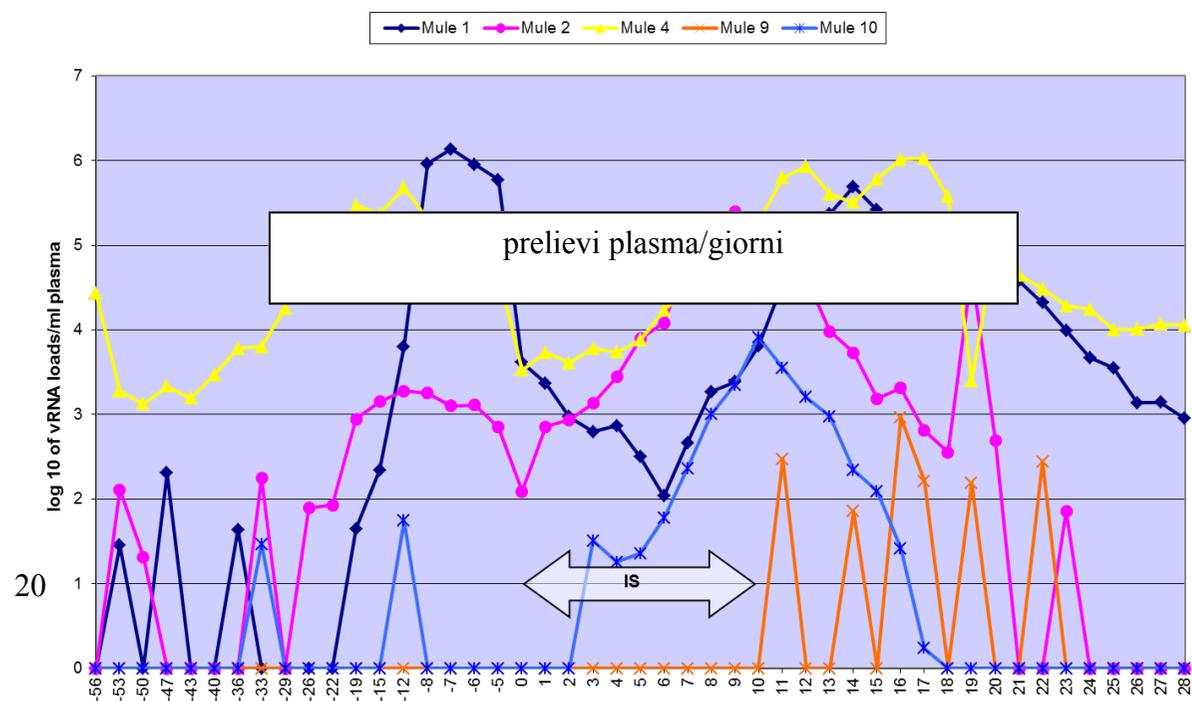


Tabella 8: Sintesi dei risultati sei saggi di qRT-PCR raccolti prima e dopo trattamento IS

Muli	N. campioni testati	N. campioni positivi	% di positivi	picco viremico ^a	giorno di rilevamento del picco ^b
gruppo N					
3	47	45	96	5,1	+17
5	46	30	65	6,8	+14
6	47	1	2	2,0	+19
7	47	4	9	3,0	+13
8	47	21	45	4,0	+14
gruppo P					
1	47	39	83	6,1	-7
2	47	34	72	5,4	+9
4	45	45	100	6,3	+16 =17
9	47	6	13	3,0	+16
10	47	17	36	3,9	+10

^a Il titolo è espresso come \log_{10} di copie di RNA/ml.

^b Giorno corrispondente al titolo più alto di RNA virale;

Sequenziamento dei prodotti della Nested-PCR

Il sequenziamento dei prodotti della nested-PCR per la ricerca del DNA provirale a partire dai buffy coats prelevati in occasione dell'arruolamento, ha confermato che tutti i muli erano infetti, indipendentemente dal differente pattern sierologico.

I ceppi, confrontati con quelli presenti in Genbank hanno mostrato similitudine nucleotidica variabile fra il 77 ed il 96% rispetto a quelle riportate per gli stiptipi europei da Quinlivan e al. (2007) e Cappelli e al. (2011). In dettaglio, le sequenze degli amplificati del DNA provirale di sei animali (muli 1, 2, 6, 7, 9 e 10) avevano una similitudine con il ceppo virale AIE EIAVRom-4 (GU060662.1), quelle dei muli 4 e 8 con il ceppo virale EIAVIta-1 (EU240733.1) e 2 muli (3 e 5) con il ceppo EIAVIta-90 (HQ888862.1).

Tali risultati sono ancora da considerare come preliminari, soprattutto per gli isolati che hanno mostrato bassa omologia, per i quali sono in corso approfondimenti e studi anche su differenti porzioni del genoma, in considerazione del fatto che la regione sequenziata è di dimensioni modeste (313bp).

Discussione

La letteratura scientifica relativa all'AIE nel mulo risulta limitata ad una sola pubblicazione in cui gli autori descrivono un'infezione sperimentale condotta in due soggetti e per un periodo di osservazione alquanto breve, insufficiente a chiarire gli aspetti patogenetici di un'infezione da retrovirus (Spyrou e al., 2003).

Pertanto il presente lavoro costituisce il primo studio osservazionale, della durata di circa quattro mesi, di un gruppo di 10 muli naturalmente infetti allo scopo di:

- migliorare le conoscenze dell'AIE, valutando le caratteristiche della malattia in animali mantenuti sia in condizioni naturali, sia a seguito di immunosoppressione (IS) farmacologica;
- verificare l'esistenza di correlazioni tra viremia e risposta immunitaria;

- allargare le conoscenze di equidi aventi un esito al test AGID negativo/dubbio ma positivo agli altri test sierologici per AIE;
- definire il rischio di diffusione connesso al mantenimento di soggetti con pattern sierologici inconclusivi rispetto ai test di conferma ufficiali.

I rilievi clinici effettuati in tutto il periodo di osservazione, hanno dimostrato che nessun animale ha avuto una forma iperacuta o acuta di malattia contrariamente a quanto osservato nella specie equina. Ad eccezione di un solo animale che ha manifestato un rialzo termico della durata di 5 giorni, in tutti gli altri animali la febbre è stata di breve durata o assente. La piastrinopenia ha interessato due soggetti rispettivamente per 5 e 7 giorni consecutivi, in 5 soggetti è stata osservata per una durata massima di 3 giorni e in tre animali mai rilevata. Altri sintomi clinici quali anemia, ittero, depressione ed edema sono stati rilevati saltuariamente nel periodo post IS.

La sintomatologia clinica descritta risulta essere aspecifica e pertanto questi animali non sarebbero stati riconosciuti infetti in un programma di sorveglianza passivo basato solo sul sospetto clinico.

Precedenti studi che hanno coinvolto equidi con pattern di reattività sierologica simili ai muli del presente studio, hanno suggerito che questi animali hanno un bassissimo livello viremico dal momento che il virus è stato trasmesso solo ad uno di 6 equidi inoculati sperimentalmente (Issel and Adams, 1982). Dal momento che la risposta umorale anticorpale dipende dall'esposizione ad una massa antigenica, si potrebbe ipotizzare che bassi livelli di titoli anticorpali contro il virus AIE e perciò con un esito al test AGID negativo o molto debole si registrerebbero in quegli equidi che, in modo inusuale, controllano la carica viremica nei loro tessuti.

In aggiunta ci sono evidenze da studi sperimentali eseguiti con cloni molecolari infettivi di virus AIE che alcuni equidi sono capaci di esercitare una sorta di controllo superiore (elite controllers) sulla replicazione del virus AIE (Cook et al., 2003). Sebbene un modello con una massa antigenica debole potrebbe spiegare risultati falsi negativi al test di AGID, questo studio suggerisce che questo meccanismo non sarebbe l'unico ad essere coinvolto.

Per esempio, tutti i sieri ottenuti dal mulo 3 non hanno reagito al test AGID mentre quelli ottenuti dal mulo 5 hanno prodotto una reattività debole al test AGID con uno score pari a 1.

Tuttavia, il livello della carica viremica plasma associata in questi due animali prima del trattamento IS era pari se non addirittura superiore a quella degli animali del gruppo P.

Di conseguenza sulla base dell'assunto di una diretta correlazione tra il livello di carica viremica RNA e il livello antigenico virale si può concludere che un basso titolo di anticorpi sierici nei muli 3 e 5 non è dovuto ad un controllo superiore o elusione della replicazione virale.

Un altro risultato significativo del presente studio è che la carica viremica plasma associata non rimane costante nel tempo in tutti i muli. Infatti in un soggetto ci sono state differenze nella carica viremica di $5,48 \log_{10}$ durante i primi 56 giorni dell'iniziale periodo di osservazione.

Questo dato ci suggerisce che durante la fase di portatore asintomatico in alcuni animali si stabilisca una relazione dinamica tra la replicazione virale e il meccanismi di controllo ospite mediato. A questo punto rimane da chiarire se queste ampie fluttuazioni della viremia plasma associata siano legate a fattori individuali dell'ospite o/e alle caratteristiche del ceppo virale coinvolto o se siano legate ad altri fattori come la durata del tempo post-infezione.

Nel presente studio non è stato possibile condurre alcuna analisi statistica dal momento che gli animali coinvolti non erano uniformi per età, sesso, razza e provenienza. Questo studio dimostra che gli equidi con una bassa o assente reazione al test di AGID e senza alcun apparente segno clinico di malattia non possono essere considerati a rischio zero o ridotto di trasmettere l'infezione.

Infatti, come dimostrato in questo studio, il rischio legato alla carica viremica tessuto associata può cambiare significativamente in alcuni equidi anche su base giornaliera.

Animali con un basso titolo di anticorpi specifici rappresentano una sfida importante quando la diagnosi di AIE si basa unicamente sull'uso del test di AGID, specialmente quando questo livello di reattività rimane costante nel tempo.

I nostri dati, in accordo con quelli ottenuti da Issel e al. (2013), indicano che l'esclusivo utilizzo dell'AGID può classificare alcuni animali falsamente negativi, permettendo la libera movimentazione di equidi infetti da AIE con il conseguente rischio di favorirne la diffusione.

La lettura del test AGID è altamente soggettiva con la possibilità che diversi positivi deboli possono essere non correttamente classificati da personale di laboratorio inesperto (Issel e al., 2013). Tuttavia, è da sottolineare che le reazioni equivoche presentate da alcuni muli arruolati in questo studio non possono essere attribuite ad una non corretta lettura del test AGID, sia perché le reazioni si sono mantenute nel tempo sia perché gli stessi campioni sono stati letti e confermati da differenti operatori appositamente addestrati e in differenti laboratori e utilizzando kits di diverse case produttrici (Issel et al., 2013). Inoltre la durata di completamento di questo studio a partire dalla diagnosi iniziale è stata di almeno 240 giorni e questo escluderebbe la possibilità che la debole reattività sierologica fosse dovuta ad una infezione recente. Pertanto sembra che alcuni equidi semplicemente non riescano a produrre sufficienti anticorpi tali da essere rilevati al test AGID. Sebbene i/meccanismi/o associati con l'induzione di una scarsa risposta umorale nei confronti del virus AIE richiedono ulteriori indagini, alcuni animali sono problematici perché non sarebbero classificati come positivi utilizzando un sistema diagnostico ad un solo livello basato sull'utilizzo del test AGID così come avviene attualmente in molti Paesi.

Inoltre anche con l'impiego di un Sistema diagnostico a due livelli (screening iniziale con il test ELISA seguita da conferma con il test AGID) animali come il mulo 3 del presente studio potrebbero essere dichiarati negativi dopo una conferma in AGID.

Sulla base di questo studio e delle considerevole esperienza acquisita nel corso del quinquennio di sorveglianza obbligatoria per AIE sul territorio nazionale l'impiego di un sistema diagnostico a tre livelli con una conferma finale con il test IB in un laboratorio di referenza designato è il sistema che offre una maggiore accuratezza ed efficacia diagnostica.

L'uso di tecniche di PCR per il rilievo del virus AIE resta difficoltoso a causa dell'alta variabilità genetica del virus, tratto distintivo della biologia dei lentivirus, associato al basso numero di copie virali che si possono riscontrare in alcuni portatori asintomatici.

Le due metodiche di PCR impiegate in questo studio sono state capaci di amplificare sequenze virali in tutti i 10 soggetti.

In particolare, la nested PCR ha rilevato il DNA provirale, estratto dai leucociti, da tutti gli animali al momento del reclutamento. La qRT-PCR, invece, ha amplificato l'RNA virale, in alcuni muli, solo nel periodo post trattamento IS e da almeno un campione di plasma.

In ogni caso questo suggerisce che sequenze verso cui sono diretti i primers e la sonda (nel caso del saggio qRT-PCR) sono molto conservate almeno per i ceppi isolati in Europa.

Conseguentemente, mentre questi saggi possono essere utili come strumenti di ricerca o utili nel caso di infezioni recenti da virus AIE quando la replicazione virale si presenta a livelli elevati, gli stessi non sono utilizzabili per la routine diagnostica dal momento che, come chiaramente mostrato nel presente studio, il virus dell'AIE presenta ampie variazioni in termini di viremia in intensità e durata.

La comunità internazionale ha cercato di armonizzare i requisiti per la diagnostica delle malattie animali e di standardizzare i reagenti al fine di assicurare uniformità diagnostica. Nel caso del virus dell'AIE, questi standard ruotano intorno a ciò che è attualmente accettato come gold-standard sierologico per la diagnosi di AIE: il test AGID. Questo è comprensibile dal momento che la ricerca ha dimostrato un'alta correlazione tra la presenza del virus (come misurato in test di inoculazioni in cavalli) e la presenza di anticorpi specifici e perché il test è di semplice e rapida esecuzione e non richiede particolari strumentazioni.

Al contrari però in un piano di eradicazione, dove l'obiettivo è quello di individuare tutti i positivi, anche in tempi ragionevoli, è necessario adottare sistemi diagnostici più sensibili ed efficienti.

Altri test sierologici, approvati a livello internazionale, hanno comunque dimostrato di produrre risultati sovrapponibili a quelli del test AGID.

Un problema molto importante per i test dotati di elevata sensibilità rispetto al test AGID è legato alla mancanza di un gold standard per la loro validazione.

I risultati presentati in questo studio e precedentemente da Issel e al., 2013, a partire da casi sperimentali e di campo hanno dimostrato un alto grado di accordo tra la presenza di materiale genetico del virus AIE e la presenza di anticorpi in cavalli che sono stati riportati come negativi al test AGID ma positivi al test ELISA ed IB. Poiché questa circostanza sembra essere più frequente rispetto all'atteso, arrivando in alcune stime al 20%, crediamo che la comunità internazionale debba incentivare gli studi sulla diagnostica dell'AIE per arrivare a degli standard diagnostici più efficaci. Tutti i produttori di kits commerciali per la diagnosi di AIE hanno settato la sensibilità del kits mediante comparazione con il test AGID. Inoltre alcuni Paesi per economicità utilizzano formati del test AGID miniaturizzati che senz'altro comportano maggiori difficoltà di interpretazione specialmente per quei campioni che hanno un basso livello di anticorpi anti-p26. Inoltre, non risulta esistere una standardizzazione dell'antigene contenuto nei kits AGID commerciali e anche questo fattore rende impossibile armonizzare l'interpretazione dei risultati per quei campioni con basso livello di anticorpi anti-p26 in questo test soggettivo. Questo studio dimostra chiaramente il valore e la necessità di integrare gli strumenti diagnostici a disposizione per migliorare la sensibilità dei piani di sorveglianza dell'AIE. Storicamente negli Stati Uniti d'America, la maggior parte degli errori riportati sono quelli in cui campioni con un basso livello del titolo anticorpale anti-p26 sono stati interpretati con il test AGID. Questi errori di interpretazione possono essere minimizzati utilizzando un test ELISA come primo livello di diagnosi. Ad oggi l'IB appare essere il test di scelta per la conferma dei casi con reazione equivoca o negativa all'immunodiffusione in quanto unico metodo in grado di rilevare anche gli anticorpi per le altre proteine strutturali del virus quali la gp45 e gp90. Bisogna tener presente che sebbene la p26 sia la proteina virale più abbondante, la risposta umorale nei suoi confronti è fino a 100 volte inferiore e più tardiva rispetto a quella diretta verso le gp45 e gp90, essendo queste ultime proteine di superficie, quindi direttamente esposte al sistema immunitario. Considerando la diagnosi di AIE complessivamente possiamo concludere che i dati clinici, sierologici o virologici presi singolarmente non garantiscono un'elevata accuratezza. Inoltre quando il test IB viene utilizzato in combinazione con il test ELISA (alta sensibilità) e il test AGID (alta specificità) esso costituisce un valido aiuto nello stabilire un algoritmo diagnostico pratico ed efficace in un sistema diagnostico di laboratorio a tre livelli.

Conclusioni

Nonostante i dati scientifici confermino la bassa sensibilità del test AGID (Issel et al., 2013), l'utilizzo di metodi diagnostici più sensibili per la diagnosi di AIE ha trovato resistenze a livello internazionale. Questioni legali possono emergere non solo tra differenti Paesi ma anche tra differenti organi ufficiali all'interno dello stesso paese in caso di controversia per un risultato sierologico discordante nei differenti metodi diagnostici, non tutti ufficialmente raccomandati.

Prendendo in considerazione le evidenze dei limiti del test AGID nel diagnosticare tutti gli equidi infetti dall'AIE è indispensabile rivedere le prescrizioni OIE in merito all'utilizzo del test AGID per il commercio internazionale, attraverso la combinazione della specificità del test AGID con l'elevata sensibilità del test ELISA/IB.

Queste modifiche potrebbero costituire un incentivo per molti Paesi ad adottare un sistema diagnostico a tre livelli aumentando l'accuratezza dei programmi di sorveglianza che si basano sull'identificazione e la rimozione degli animali sieropositivi. L'utilizzo di un sistema diagnostico in serie risulterebbe particolarmente utile non solo nella fase finale di un programma di eradicazione dell'infezione quando la probabilità di infezioni recenti è alta ma anche per la diagnosi di AIE in quegli equidi con una costante bassa/ o nulla risposta anticorpale e quindi reattività al test AGID.

Un ulteriore vantaggio di questo approccio diagnostico rilevato durante il programma di sorveglianza Nazionale è il giovamento derivante dall'utilizzo dello stesso nei focolai della malattia per la sua precocità nel rilevare i nuovi casi indicenti.

In conclusione possiamo dire che per raggiungere un alto livello di accuratezza per la diagnosi di AIE, i dati scientifici fin qui disponibili suggeriscono l'utilizzo del sistema diagnostico a tre livelli con l'integrazione di metodi molecolari. Questo sarebbe necessario al fine di coprire l'ampio spettro di reazioni umorali e virologiche che gli equidi infetti possono presentare.

La carica viremica ha mostrato una notevole variazione in tutti i muli evidenziata anche prima del trattamento IS.

Nessuna correlazione apparente è stata osservata tra la carica viremica e la reattività sierologica ai test di immunodiffusione ed immunoenzimatico.

Questo lavoro dimostra che la carica viremica in soggetti risultati ELISA/ IB positivi e AGID negativi è sovrapponibile a quella di muli con reazioni positive ai tre test sierologici.

Pertanto, muli con reattività sierologica ELISA/ IB positivi e AGID negativi non devono essere considerati a basso rischio di trasmissione dell'infezione.

Studi filogenetici e di epidemiologia molecolare del virus dell'AIE

Le analisi sulle sequenze condotte dall'UO 3 sono riferite ai prodotti di amplificazione delle PCR dei campioni risultati positivi di cui alla precedente linea di ricerca "Attività di ricerca virologica su soggetti risultati positivi nel corso delle attività di sorveglianza sierologica" e su altri campioni collezionati dal Centro di referenza nel corso degli anni.

Le analisi filogenetiche sono state condotte su 57 campioni e hanno riguardato: a) l'amplificazione delle regioni genomiche codificanti per *gag* per 56 campioni; b) l'amplificazione di un tratto della regione genomica codificante per *pol* per 1 campione (Mulo n.4 di cui alla linea di ricerca "Studio trasversale su muli positivi con diverso pattern sierologico ai fini della verifica quali/quantitativa dei titoli viremici anche per la valutazione del rispettivo rischio di trasmissione dell'infezione").

Protocolli utilizzati

1.1) PROTOCOLLO PCR gag caratterizzazione genoma AIE (Cappelli et al 2011)

Kit utilizzato: Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen)

Master Mix PCR1 (EIAV-1F/EIAV-1R)			
Reagente	Conc. iniziale	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile			34,34
10X Platinum Buffer	10	1	5
dNTPs mix 10 mM	10	0,5	2,5
MgSO ₄ 50 mM	50	2	2
Primer EIAV-1F 30 µM	30	0,2	0,33
Primer EIAV-1R 30µM	30	0,2	0,33
Stampo c-DNA (DNA)			5
Platinum Pfx DNA Polymerase 2,5U/µl	2,5	0,025	0,5
		tot	50

CICLO PCR1:
94°C per 10 minuti
35 cicli composti da: 94°C per 15 secondi, 52°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi
72°C per 10 minuti

Prodotto PCR 1: 547 bp

PRIMER UTILIZZATI NELLA PREPARAZIONE DELLA MASTER MIX PCR1:

EIAV-1F (EIAV DNAITA F): 5'-GACATGGAGCAAAGCGCTCA-3'.

EIAV-1R (EIAV DNAITA R): 5'-CTGCCAGGCACCACATCTA-3'.

Kit utilizzato: Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen)

Master Mix PCR2 (EIAV-2F/EIAV-2R)			
Reagente	Conc. iniziale	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile			34,34
10X Platinum Buffer	10	1	5
dNTPs mix 10 mM	10	0,5	2,5
MgSO ₄ 50 mM	50	2	2
Primer EIAV-2F 30 µM	30	0,2	0,33
Primer EIAV-2R 30µM	30	0,2	0,33
Stampo c-DNA (DNA)			5
Platinum Pfx DNA Polymerase 2,5U/µl	2,5	0,025	0,5
		tot	50

CICLO PCR2:
94°C per 10 minuti
35 cicli composti da: 94°C per 20 secondi, 52°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi
72°C per 10 minuti

Prodotto PCR: 313 bp

PRIMER UTILIZZATI NELLA PREPARAZIONE DELLA MASTER MIX Nested-PCR2:

EIAV-2F (EIAV DNAITA NSTD F): 5'-TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG-3'

EIAV-2R (EIAV DNAITA NSTD R): 5'-TTTCTGTTTCCAGCCCCATC-3'

1.2) PROTOCOLLO PCR LTR-tat caratterizzazione genoma AIE (Dong et al. 2012)

Kit utilizzato: Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen)

Master Mix PCR1 (EIAVvan-1F/EIAVvan-1R)			
Reagente	Conc. iniziale	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile			34,34
10X Platinum Buffer	10	1	5
dNTPs mix 10 mM	10	0,5	2,5
MgSO ₄ 50 mM	50	2	2
Primer EIAVvan-1F 30 µM	30	0,2	0,33
Primer EIAVvan-1R 30µM	30	0,2	0,33
Stampo c-DNA (DNA)			5
Platinum Pfx DNA Polymerase 2,5U/µl	2,5	0,025	0,5
		tot	50

CICLO PCR1:
94°C per 10 minuti
35 cicli composti da: 94°C per 30 secondi, 52°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi
72°C per 10 minuti

Prodotto PCR 1: 246bp

PRIMER UTILIZZATI NELLA PREPARAZIONE DELLA MASTER MIX PCR1:**EIAVvan-1F (EIAVltr-1F): 5'-GACAGTTGGGCACTCAGATT-3'****EIAVvan-1R (EIAVltr-1R): 5'CAGGAACACCTCCAGAAGAC-3'****Kit utilizzato: Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen)**

Master Mix Nested-PCR2 (EIAVvan-2F/EIAVvan-2R)			
Reagente	Conc. iniziale	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile			34,34
10X Platinum Buffer	10	1	5
dNTPs mix 10 mM	10	0,5	2,5
MgSO ₄ 50 mM	50	2	2
Primer EIAVvan-2F 30 µM	30	0,2	0,33
Primer EIAVvan-2R 30µM	30	0,2	0,33
Stampo c-DNA (DNA)			5
Platinum Pfx DNA Polymerase 2,5U/µl	2,5	0,025	0,5
		tot	50
CICLO PCR2:			
94°C per 10 minuti			
35 cicli composti da: 94°C per 30 secondi, 58°C per 30 secondi, 72°C per 40 secondi			
72°C per 10 minuti			
<i>Prodotto PCR: 198-203bp</i>			

PRIMER UTILIZZATI NELLA PREPARAZIONE DELLA MASTER MIX Nested-PCR2:**EIAVvan-2F (EIAVltr-2F): 5'-ATTCTGCGGTCTGAGTCCCT-3'****EIAVvan-2R (EIAVltr-2R): 5'-TAAGTTCTCCTCTGCTGTCC-3'****1.3 PROTOCOLLI TESTATI MA NON FUNZIONANTI**PRIMER TESTATI (Quinlivan, R. et al. 2007):**EIAV₁₆₆₃: 5'-GCAAACAGGCCTGGACATTTT-3'****EIAV_{Ire 1879}: 5'-GCTCTAGACTCCCACAACTGTTCAAATTGAGATCCT-3'**PRIMER TESTATI (Cappelli K. Et al., 2011):**EIAV 208: 5'-CGGTCTGAGTCCCTTCTCTG-3'****EIAV 2070: 5'-TTCCACATTTCCCTCCCACTC-3'****EIAV 450: 5'-ATGGGAGACCCAGTGACATGGAGCAAA-3'****EIAV 1879: 5'-CTCCCACAACTGTTCAAATTGAGATCCT-3'****LTR 5' [1B]: 5'-GGACAGCAGAGGAGA ACTTACAGA-3'****POL [5]: 5'-GTGAAAGCTGTATATGGTCTAAACTCTTGGA-3'****LTR 5' [1C]: 5'-GTCTTCTGGAGGTGTTCCCTGGCCA-3'****GAG 3' end [3]: 5'-TGAGCCCCTTGYTTCCCGTTTTTTGG-3'****GAG 5' [2]: 5'-AACATGGTGGGCAATTKYTGCTGT-3'****POL [4]: 5'-GTGAGTGGCCATTGAGGAATTTTTGGCC-3'**

1.4 PROTOCOLLI *POL* dimostratisi efficienti

PRIMERS disegnati ed impiegati (**Capomaccio non pubblicati**):

Primer pol Forward: 5'-CAATGCAGAAATGCTCCAAA-3'

Primer pol Reverse: 5'-GTCCTGGTTAAAGGCACAGC-3'

PROTOCOLLO SINTESI cDNA DA STAMPO A RNA (kit impiegato: High Capacity cDNA Archive kit, Applied Biosystems)	
Reagente	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O _{DEPC}	12,6
Buffer 10X	6
dNTPs mix 25X	2,4
Random Primers 10X	6
Reverse transcriptase (50U/µl)	3
Stampo a RNA	30
VOLUME TOTALE	60
CICLO AMPLIFICAZIONE: 25°C per 10 minuti 37°C per 45 minuti 4°C ∞	

PROTOCOLLO PCR DA STAMPO A cDNA UTILIZZANDO I PRIMER pol FORNITI DA STEFANO CAPOMACCIO (kit impiegato: iProof High Fidelity Master Mix, Biorad)		
Reagente	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile		3,74
2X iProof Master Mix	1	10
Primer pol Fw 30 µM	0,5	0,33
Primer pol Rv 30µM	0,5	0,33
DMSO (100%)	3%	0,6
Stampo c-DNA		5
	tot	20
CICLO AMPLIFICAZIONE: 98°C per 3 minuti 35 cicli: 98°C per 10 secondi, 55°C per 1:50 minuti, 72°C per 90 secondi (1:30 minuti) 72°C per 10 minuti		
PRODOTTO DI PCR: 3500bp		

Non essendo possibile sequenziare amplificati di tali dimensioni, è stata disegnata una nuova coppia di primer *POL*, partendo dalla sequenza depositata in GenBank con A. N. **L0669.1**. Il primer forward si estende dal nucleotide 1250 al nucleotide 1269, ossia 93 nucleotidi a monte della sequenza *pol* e quindi è posto alla fine della sequenza codificante per *gag*. Il primer reverse si estende dal nucleotide 2126 al nucleotide 2102, ossia è posto all'interno della sequenza codificante per *pol* (più precisamente è posto 694 nucleotidi a monte della porzione 3' terminale relativa alla sequenza codificante per *pol*). Il prodotto della PCR è 877bp. La T_m del primer forward è di 59,33°C e la T_m del primer reverse è di 57,43°C.

PRIMER POL UO3:

POL Roma Forward: 5'-GCCACTAAAGGCAGCACAAA-3'

POL Roma Reverse: 5'-GATCTTGTAAATAACCTCCATTTGCT-3'

PROTOCOLLO DA STAMPO A DNA e KIT IMPIEGATO: AmpliTaq Gold, Applied Biosystems

Reagente	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile		32,3
Buffer 10X	1X	5
dNTPs mix 10X	0,2 mM	1
MgCl ₂ 25 mM	1,5mM	3
Primer POL Roma F 30µM	1 µM	1,6
Primer POL Roma R 30µM	1 µM	1,6
AmpliTaq Gold 5U/ µl	0,05U/ µl	0,5
Stampo DNA		5

CICLO AMPLIFICAZIONE

95°C per 10 minuti

35 cicli costituiti da: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C, 1 minuto a 72°C

72°C per 10 minuti

I risultati dell'amplificazione sono: a) un'unica banda da 300bp.**PROTOCOLLO DA STAMPO A DNA e KIT IMPIEGATO: iProof High-Fidelity Master Mix, BIORAD**

Reagente	Conc. finale	Volume per 1 campione (µl)
H ₂ O grado reagente sterile		3,08
2X iProof Master Mix	1X	10
Primer POL Roma F 30µM	1 µM	0,66
Primer POL Roma R 30µM	1 µM	0,66
DMSO 100%	3%	0,6
Stampo DNA		5
Volume totale		20

CICLO AMPLIFICAZIONE

98°C per 3 minuti

35 cicli costituiti da: 1 secondo a 98°C, 1 minuto a 54°C, 1 minuto a 72°C

72°C per 10 minuti

I risultati dell'amplificazione sono: a) una banda da 300bp; b) 1500bp.La banda di 1500bp è stata quindi sottoposta a esame mediante NGS i cui risultati seguono nello specifico report dell' UO 11.

Risultati

L'esame delle sequenze ottenute amplificando le regioni genomiche *LTR-tat* e *gag* hanno mostrato la circolazione di 14 diversi ceppi che di seguito riportiamo:

- 1) 2 ceppi con Accession Number GQ996590.1, sequenza originaria dell'Austria
- 2) 1 ceppo con Accession Number HQ888862.1, sequenza originaria dell'Italia
- 3) 1 ceppo con Accession Number JX003259.1, sequenza originaria del Giappone
- 4) 1 ceppo con Accession Number JQ627103.1, sequenza originaria della Slovenia
- 5) 4 ceppi con Accession Number GQ996596.1, sequenza originaria dell'Austria
- 6) 4 ceppi con Accession Number GQ996594.1, sequenza originaria dell'Austria
- 7) 1 ceppo con Accession Number JX003262.1, sequenza originaria del Giappone
- 8) 1 ceppo con Accession Number JX003263.1, sequenza originaria del Giappone
- 9) 1 ceppo con Accession Number GQ996593.1, sequenza originaria dell'Austria
- 10) 2 ceppi con Accession Number KF878271.1, sequenza originaria della Germania
- 11) 1 ceppo con Accession Number KF878274.1, sequenza originaria della Germania
- 12) 1 ceppo con Accession Number JQ627096.1, sequenza originaria della Slovenia
- 13) 1 ceppo con Accession Number HM177438.1, sequenza originaria dell'Italia
- 14) 1 ceppo con Accession Number NC_001450, sequenza originaria della Grecia

Inoltre, in un campione, è stata osservata contemporaneamente la presenza di più di un ceppo (campione n. 11044910).

L'esame della sequenza ottenuta amplificando la sequenza genomica *pol* ha mostrato la circolazione di un ulteriore ceppo:

- 15) 1 ceppo con Accession Number K247554, sequenza originaria dell'Italia

Fra i protocolli impiegati il più efficiente è risultato quello di Dong: 19 campioni su 22 sequenziati erano positivi a tale PCR. Solo 2 campioni sono risultati positivi alla PCR Cappelli e per 1 solo campione è stato possibile esaminare l'amplificato ottenuto con i primer POL disegnati nel corso della ricerca.

Le sequenze ottenute con la PCR Dong mostrano la presenza di mutazioni all'interno della regione amplificata (203 bp) che si estende dalla regione genomica codificante per *LTR* fino all'inizio di *gag* e comprendente *tat*; sebbene la porzione genomica di 203bp amplificata dalla PCR Dong sia più conservata rispetto alla regione genomica amplificata da Cappelli.

Il sequenziamento ottenuto dal campione Mulo n.4 con la tecnica NGS a partire dall'amplificato ottenuto con i primer POL, specifici per una porzione di 798bp interna alla regione genomica *pol*, ha mostrato sia la presenza di extra-nucleotidi che la perdita di una piccola sequenza in basi all'interno della regione *gag* codificante per p26. Comunque si riesce a risalire alla sua origine che corrisponde al ceppo Irish 2006 (Quinlivan et al) da cui è derivato il ceppo con Accession Number K247554.1; Equine infectious anemia virus isolate DE, partial cds; Italia.

Le tabelle relative ai 14 ceppi circolanti con la descrizione dei campioni esaminati vengono riportate nell'allegato 1.

Come si può osservare dall'elenco delle sequenze sopra riportate, la maggior parte di queste (11/14) converge con sequenze del gruppo europeo, originarie da differenti nazioni del continente, mentre solo le rimanenti 3 mostrano similitudine con sequenze depositate dal nostro paese o comunque originarie dell'Italia.

Considerato che il sistema Traces dimostra che la maggior parte delle movimentazioni degli equidi è in entrata verso l'Italia, è verosimile che tali ceppi siano stati diffusi nel nostro paese attraverso con l'introduzione di partite di equidi infetti.

Ciò dimostrerebbe che l'assenza di controlli prima degli scambi da paesi in cui non sono attivi sistemi di sorveglianza per l'AIE costituisce uno dei principali fattori di rischio per la diffusione dell'infezione.

E' di particolare interesse il riscontro di 2 ceppi che mostrano similitudine rispetto ad isolati le cui sequenze sono state depositate dal Giappone (AN JX003262.1 ed AN JX003263.1), rispetto ai quali non siamo in grado di formulare al momento ipotesi. Su tali campioni sono già iniziati approfondimenti per verificare se le sequenze di altre porzioni del genoma siano in grado di confermare i risultati preliminari.

Ulteriori analisi filogenetiche sono state condotte anche dalla UO 11 (Dipartimento di Medicina Veterinaria di Perugia) presso la quale DNA ed RNA derivante da 103 campioni di un numero limitato di soggetti (sangue o/e organi) sono stati analizzati amplificando i geni codificanti due regioni significative del genoma virale: la nucleoproteina capsidica GAG e la polimerasi *Pol*. Gli acidi nucleici analizzati partendo da campioni, collezionati dall'Istituto Zooprofilattico del Lazio e Toscana e dalla stessa UO, provenivano da casi di EIA clinicamente manifesti o da cavalli sierologicamente positivi, nonché da muli sierologicamente positivi e sottoposti sperimentalmente ad immunosoppressione. In tutti i campioni è stato possibile produrre un amplificato dal provirus (genoma virale integrato nella cellula ospite) per il gene *gag* utilizzando primer specifici per ceppi circolanti in Italia derivanti dal lavoro di Cappelli e collaboratori (Cappelli et al., 2010) mentre non è stato possibile ottenere tutti gli amplificati per il gene *pol*. Per tutti i campioni derivanti da soggetti con malattia clinicamente manifesta e da qualche soggetto asintomatico sierologicamente positivo, è stato possibile ottenere anche l'amplificato e la corrispondente sequenza del gene *gag* partendo da RNA virale attraverso l'utilizzo dei primer derivanti dal lavoro Quinlivan e collaboratori (Quinlivan et al., 2007).

Per quanto riguarda l'amplificazione del gene *pol*, invece, i primer sono stati disegnati a partire da tutte le sequenze di *pol* disponibili in GenBank previa creazione di una sequenza consenso attraverso multi-allineamento.

Con il consenso ottenuto sono stati tentati due test molecolari:

1. Uno con finalità di isolare l'intera sequenza target (amplificato di circa 3403 paia basi)
2. Ed un altro per un approccio "nested" con due amplificazioni più piccole, una al 5' e una al 3' (1792 e 1618 bp rispettivamente) che avessero una zona di sovrapposizione per la corretta ricostruzione della sequenza totale.

La sequenza dei primer è qui di seguito riporta in Tabella 1.

Tabella 1. Combinazioni di primer per l'amplificazione della gene *pol* del genoma di EIAV.

Name	Sequence
POL_FOR	CAATGCAGAAATGCTCCAAA
POL_REV	GTCCTGGTTAAAGGCACACG
POL5'_FOR	GGAAACAAGGGGCTCAGG
POL5'_REV	CAGTCTCCAATCATCATGAACAA
POL3'_FOR	CAAATGGGAAATGGAAAAGG
POL3'_REV	TCCATCACCTTCCACAACA

Purtroppo, difficoltà nell'amplificazione e nel clonaggio hanno impedito l'ottenimento di sequenze da questo test.

A questo punto è stata tentata l'amplificazione dell'intero genoma virale utilizzando la strategia di Dong e collaboratori (Dong et al., 2012) ottenendo un amplificato di circa 8000 bp con una "Long Run PCR".

Sono stati ottenuti buoni amplificati del DNA provirale per tutti i campioni derivanti da soggetti sintomatici, quindi viremici al momento del prelievo, mentre non sono state ottenute amplificazioni dell'intero frammento nei campioni di RNA degli stessi soggetti ed in quelli di DNA di soggetti asintomatici.

Sono stati pertanto selezionati per il sequenziamento due campioni sintomatici (RL9 e RL8) derivanti da soggetti di uno stesso focolaio nei quali la malattia ha avuto un decorso molto diverso: RL9 riferito ad un puledro che ha manifestato una forma acuta di Anemia Infettiva e che è venuto a morte dopo 5gg dall'insorgenza dei sintomi e RL8 riconducibile ad un puledro che ha contratto anch'esso la malattia in forma acuta appartenente allo stesso focolaio, e che poi ha cronicizzato la malattia avendo presentato numerosi episodi febbrili nel corso dei 5 mesi successivi prima di essere sottoposto ad eutanasia.

In questi due soggetti, infettatisi nello stesso momento e dalla stessa fonte, ma che hanno poi manifestato forme cliniche differenti di malattia, era ipotizzabile un diverso tasso di mutazione del genoma provirale: il virus del soggetto RL8 avendo avuto più volte fasi viremiche doveva essere maggiormente mutato rispetto a quello isolabile in RL9.

Una volta ottenuto l'amplificato purificato è stato effettuato un sequenziamento NGS (Next Generation Sequencing) utilizzando la piattaforma Roche Flex 454.

In breve, l'amplificato ottenuto è stato frammentato meccanicamente per costruire una libreria poi amplificata in PCR ad emulsione. I frammenti clonali unici sono stati sequenziati mediante pirosequenziamento massivo parallelo. In questo modo, è stato ottenuto un coverage (ridondanza di sequenziamento di una base) medio, superiore a 1800X.

Le reads ottenute sono state mappate su di un genoma di riferimento, JX480631, ottenuto in Irlanda da Quinlivan e collaboratori attraverso il metodo classico di sequenziamento (Quinlivan et al., 2013).

Le sequenze consenso ottenute sono state sottomesse in GenBank con i seguenti numeri di accessione: KM247554 e KM247555. Il genoma ottenuto, ha una lunghezza totale di 7841 paia di

basi (non contiene la totalità delle sequenze Long Terminal Repeats) e contiene la totalità delle sequenze codificanti proteina del virus.

Il vantaggio di un sequenziamento NGS sta appunto nel coverage elevato che si ottiene per ogni singola base sequenziata, caratteristica che permette, contrariamente ad un classico sequenziamento Sanger, mediante l'utilizzo di software specifici di effettuare una "variant calling". Tale procedura consente di valutare le differenze di sequenza che il campione in esame ha rispetto ad una sequenza utilizzata come reference, nel nostro caso, quindi, ha permesso di individuare le mutazioni accumulate dalle varianti del virus nel corso di un focolaio. La procedura è stata effettuata utilizzando un' apposita pipeline bioinformatica composta dai seguenti passi:

- Mappaggio delle reads attraverso l'allineatore *bwa* ottimizzando per reads lunghe (LI and Durbin, 2012).
- Deduplicazione (eliminazione di reads duplicate per effetto della PCR) attraverso Picard, <http://picard.sourceforge.net>
- Chiamata delle varianti mediante il software GATK *UnifiedGenotyper*, con parametri di default (McKenna et al., 2010).

Le varianti nucleotidiche chiamate (61 per RL9 e 66 per RL8) sono state annotate mediante software Annovar (Tabella 2 e Tabella 3). Di queste, 37 risultano comuni ad entrambi i genomi virali, mentre le altre (24 per RL9 e 29 per RL8) risultano essere private.

Tabella 2. Varianti trovate nel campione RL8. REF e ALT si riferiscono all'allele di riferimento e all'alternativo rispettivamente.

Position (JX480631 based)	RL8/RL8 Match	REF	ALT	Aminoacid Change	Non synonymous
1051	COMMON	T	A	AFW99164.1:p.Asp199Glu	Yes
3254	COMMON	A	G	AFW99165.1:p.Lys528Arg	Yes
3319	COMMON	A	G	AFW99165.1:p.Thr550Ala	Yes
3622	COMMON	C	T		No
3644	COMMON	C	T	AFW99165.1:p.Thr658Ile	Yes
4218	COMMON	T	C		No
4375	COMMON	T	C	AFW99165.1:p.Tyr902His	Yes
4828	SPECIFIC	C	G	AFW99165.1:p.Gln1053Glu	Yes
5465	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.[Lys49Glu]	Yes
5627	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Thr103Ala	Yes
5822	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Ile168Val	Yes
5886	SPECIFIC	T	C	AFW99167.1:p.Val189Ala	Yes
5891	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Asp191Asn	Yes
5903	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Lys195Gly	Yes
5904	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Lys195Gly	Yes
5906	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn196Gly	Yes
5907	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn196Gly	Yes
5939	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.Gly207Arg	Yes
5961	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Gln214Arg	Yes
6027	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Arg236Gln	Yes
6081	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.Arg254Lys	Yes
6179	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.Asp287Ser	Yes
6180	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asp287Ser	Yes
6270	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Asn317Ser	Yes

6288	COMMON	G	C,T	AFW99167.1:p.Arg323Thr	Yes
6291	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Asn324Ser	Yes
6296	SPECIFIC	A	T	AFW99167.1:p.Asn326Tyr	Yes
6302	SPECIFIC	C	T	AFW99167.1:p.Pro328Ser	Yes
6343	COMMON	A	C	AFW99167.1:p.Lys341Asn	Yes
6355	SPECIFIC	T	C		No
6371	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Asp351Asn	Yes
6396	COMMON	G	T	AFW99167.1:p.Arg359Met	Yes
6398	SPECIFIC	T	C	AFW99167.1:p.Tyr360His	Yes
6408	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Asp363Gly	Yes
6413	SPECIFIC	G	C	AFW99167.1:p.Val365Leu	Yes
6449	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.Asp377Asn	Yes
6451	SPECIFIC	T	A	AFW99167.1:p.Asp377Glu	Yes
6453	COMMON	C	T	AFW99167.1:p.Thr378Ile	Yes
6539	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Thr407Ala	Yes
6540	COMMON	C	A	AFW99167.1:p.Thr407Lys	Yes
6545	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn409Asp	Yes
6546	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Asn409Gly	Yes
6648	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Asn443Ser	Yes
6662	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Val448Ile	Yes
6673	SPECIFIC	A	G		No
6700	COMMON	G	A		No
6841	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Ile507Met	Yes
6846	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.Arg509Lys	Yes
6855	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn512Ser	Yes
6957	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Lys546Arg	Yes
7305	COMMON	C	G	AFW99167.1:p.[Ala662Gly]; AFW99168.1:p.[Cys46Trp]	Yes
7311	SPECIFIC	C	T	AFW99167.1:p.[Ser664Phe]	Yes
7320	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.[Arg667His]	Yes
7367	COMMON	A	C	AFW99167.1:p.[Asn683His]; AFW99168.1:p.[Glu67Ala]	Yes
7403	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.[Ser695Gly]; AFW99168.1:p.[Lys79Arg]	Yes
7434	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.[Asn705Ser]	Yes
7508	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.[Lys730Glu]; AFW99168.1:p.[Glu114Gly]	Yes
7509	COMMON	A	C	AFW99167.1:p.[Lys730Thr]; AFW99168.1:p.[Glu114Asp]	Yes
7510	COMMON	G	A	AFW99168.1:p.[Val115Ile]	Yes
7520	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.[Glu734Lys]; AFW99168.1:p.[Gly118Glu]	Yes
7529	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.[Lys737Glu]; AFW99168.1:p.[Lys121Arg]	Yes
7553	COMMON	T	A	AFW99167.1:p.[Tyr745Asn]; AFW99168.1:p.[Leu129Gln]	Yes
7554	SPECIFIC	A	C	AFW99167.1:p.[Tyr745Ser]	Yes
7556	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.[Glu746Lys]; AFW99168.1:p.[Arg130Gln]	Yes
7571	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.[Ala751Thr]; AFW99168.1:p.[Ser135Asn]	Yes
8046	COMMON	G	A	-	-

Tabella 3. Varianti trovate nel campione RL9. REF e ALT si riferiscono all'allele di riferimento e all'alternativo rispettivamente.

Position (JX480631 based)	RL8/RL8 Match	REF	ALT	Aminoacid Change	Non synonymou s
772	SPECIFIC	A	T		No
1051	COMMON	T	A	AFW99164.1:p.Asp199Glu	Yes
1273	SPECIFIC	G	A		No
1426	SPECIFIC	A	G		No
1580	SPECIFIC	C	T	AFW99164.1:p.Pro376Ser	Yes
1672	SPECIFIC	A	G	AFW99165.1:p.[Thr1Ala]	Yes
2045	SPECIFIC	G	A	AFW99165.1:p.Arg125Lys	Yes
2877	SPECIFIC	G	A		No
3254	COMMON	A	G	AFW99165.1:p.Lys528Arg	Yes
3319	COMMON	A	G	AFW99165.1:p.Thr550Ala	Yes
3622	COMMON	C	T		No
3644	COMMON	C	T	AFW99165.1:p.Thr658Ile	Yes
3747	SPECIFIC	T	G		No
4059	SPECIFIC	T	G		No
4218	COMMON	T	C		No
4278	SPECIFIC	A	G		No
4375	COMMON	T	C	AFW99165.1:p.Tyr902His	Yes
4596	SPECIFIC	A	G		No
5423	SPECIFIC	G	A	AFW99166.1:p.[Met43Ile]; AFW99167.1:p.[Glu35Lys]	Yes
5465	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.[Lys49Glu]	Yes
5627	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Thr103Ala	Yes
5822	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Ile168Val	Yes
5891	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Asp191Asn	Yes
5904	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Lys195Arg	Yes
5906	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn196Asp	Yes
5907	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn196Ser	Yes
6013	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Ile231Met	Yes
6027	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Arg236Gln	Yes
6180	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asp287Gly	Yes
6183	SPECIFIC	A	T	AFW99167.1:p.Asn288Ile	Yes
6288	COMMON	G	C	AFW99167.1:p.Arg323Thr	Yes
6343	COMMON	A	C	AFW99167.1:p.Lys341Asn	Yes
6348	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.Ser343Asn	Yes
6354	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Asn345Ser	Yes
6371	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Asp351Asn	Yes
6396	COMMON	G	T	AFW99167.1:p.Arg359Met	Yes
6453	COMMON	C	T	AFW99167.1:p.Thr378Ile	Yes
6489	SPECIFIC	T	C	AFW99167.1:p.Ile390Thr	Yes
6539	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Thr407Ala	Yes
6540	COMMON	C	A	AFW99167.1:p.Thr407Lys	Yes
6545	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn409Asp	Yes
6662	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.Val448Ile	Yes

6700	COMMON	G	A		No
6851	SPECIFIC	A	G	AFW99167.1:p.Ile511Val	Yes
6855	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Asn512Ser	Yes
6957	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.Lys546Thr	Yes
7007	SPECIFIC	C	T	AFW99167.1:p.Leu563Phe	Yes
7045	SPECIFIC	T	A		No
7305	COMMON	C	G	AFW99167.1:p.[Ala662Gly]; AFW99168.1:p.[Cys46Trp]	Yes
7367	COMMON	A	C	AFW99167.1:p.[Asn683His]; AFW99168.1:p.[Glu67Ala]	Yes
7509	COMMON	A	C	AFW99167.1:p.[Lys730Thr]; AFW99168.1:p.[Glu114Asp]	Yes
7510	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.[Lys730Thr]; AFW99168.1:p.[Val115Ile]	Yes
7529	COMMON	A	G	AFW99167.1:p.[Lys737Glu]; AFW99168.1:p.[Lys121Arg]	Yes
7550	SPECIFIC	G	A	AFW99167.1:p.[Asp744Asn]; AFW99168.1:p.[Arg128Gln]	Yes
7553	COMMON	T	A	AFW99167.1:p.[Tyr745Asn]; AFW99168.1:p.[Leu129Gln]	Yes
7556	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.[Glu746Lys]; AFW99168.1:p.[Arg130Gln]	Yes
7571	COMMON	G	A	AFW99167.1:p.[Ala751Thr]; AFW99168.1:p.[Ser135Asn]	Yes
7580	SPECIFIC	G	C	AFW99167.1:p.[Ala754Pro]; AFW99168.1:p.[Ser138Thr]	Yes
7639	SPECIFIC	G	A	AFW99168.1:p.[Gly158Arg]	Yes
7888	SPECIFIC	C	T		No
8046	COMMON	G	A	-	-

La quasi totalità delle varianti produce delle sostituzioni aminoacidiche non sinonime (47/61 RL9, 60/66 RL8) evidenziando che il campione derivante dall'animale che ha subito più picchi febbrili, ha un accumulo di mutazioni che modificano più pesantemente la sequenza proteica. Tali varianti sono in via di caratterizzazione mediante approfondimento bio-informatico al fine di predire l'effetto della mutazione a carico della proteina nel sito specifico.

a) Analisi filogenetica dei ceppi mediante specifici programmi

Tutte le sequenze di *gag* ottenute sono state analizzate dal punto di vista filogenetico come segue attraverso la metodologia utilizzata da Capomaccio e collaboratori (Capomaccio et al., 2012). In breve, tutte le sequenze *gag* disponibili in GenBank e di lunghezza superiore a 400bp sono state allineate insieme a quelle prodotte all'interno del progetto e provenienti da collaborazioni internazionali, in modo da rappresentare al meglio la variabilità conosciuta a livello mondiale di questa porzione di virus. Come outgroup è stata utilizzata la sequenza di lentivirus endogeno di lagomorfi (RELİK).

L'allineamento risultante è stato partizionato secondo le posizioni dei codoni, ed è stato calcolato il miglior modello evolutivo da utilizzare nell'analisi filogenetica (GTR + G) implementata nel software MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Per l'analisi filogeografica, effettuata con il software BEAST (Drummond and Rambaud, 2007), sono state definite 4 are macrogeografiche. La corrispondenza tra filogenesi e filogeografia è stata verificata attraverso l'utilizzo del software BaTS (Parker et al., 2008).

Valutazione dei risultati ottenuti nel loro risvolto genetico ed epidemiologico

Il sequenziamento massivo dei due genomi provirali provenienti da un focolaio italiano da la percezione di quanto il genoma del virus possa variare in funzione della permanenza nell'animale e del numero dei picchi febbrili. Tra l'altro la maggior parte di variabilità attesa, che porta al fenomeno delle cosiddette *quasispecie* virali, la dovremmo riscontrare nel genoma virale RNA (del quale ancora non abbiamo dati) piuttosto che nel genoma provirale.

I risultati dell'analisi filogenetica confermano che il virus dell'anemia infettiva equina è fortemente regionalizzato, anche se ulteriori sequenziamenti sono necessari per risolvere l'estrema variabilità di cui esso è portatore possibilmente riuscendo ad associare a questo dato differenti caratteristiche di patogenicità.

Dall'osservazione dell'albero filogenetico in Figura 1 si potrebbe ipotizzare che alcuni dei ceppi circolanti in Italia appartengano a virus provenienti da paesi terzi quali ad esempio la Romania. I campioni forniti dall'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana provenienti da muli infetti sottoposti a immuno-soppressione hanno fornito risultati interessanti: due delle sequenze ottenute secondo il metodo Cappelli et al. 2010, appartenenti al soggetto 1 ed al soggetto 5, convergono con il gruppo delle sequenze europee, ed in particolare manifestano elevata similarità con le accessioni HQ888862 (Ita90, Sella Italiano) e HQ888861 (Ita87, Mulo).

Questi campioni appartengono filogeneticamente al gruppo delle sequenze rumene, il che lascerebbe presupporre che la variabilità presente in Italia potrebbe essere di gran lunga maggiore di quella riscontrata (comunque tracciabile come variabilità europea) e che il ramo dei focolai Italiano-Irlandese sia semplicemente il più rappresentato (in termini di numero di sequenze prodotte).

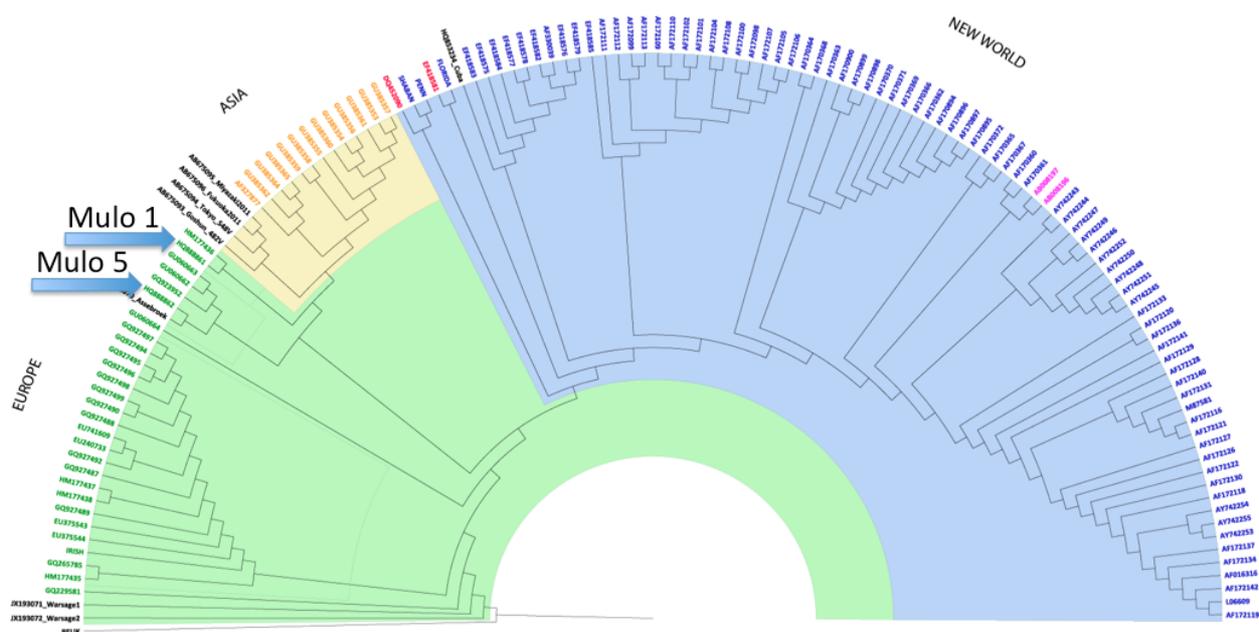


Figura 1. Albero filogenetico rappresentante l'intera variabilità genetica del virus dell'anemia infettiva a partire dalla proteina *gag*. Le zone colorate in verde, giallo e azzurro si riferiscono rispettivamente a Europa, Asia e Nuovo Mondo. In evidenza le sequenze dei soggetti 1 e 5 (muli della prova di cui alla sezione di ricerca precedente).

Con i dati ottenuti da tutti i campioni (anamnestici, sierologici, molecolari) è stato allestito un database EIAVDB, con lo scopo di testare come poter migliorare il database europeo esistente per questa malattia. Il database OIE, infatti, si occupa principalmente di effettuare un report, un censimento malattia specifico diviso per nazione.

I dati collezionati in quest'ultimo non valorizzano informazioni importanti ai fini della ricerca scientifica ed in particolare per il virus dell'Anemia Infettiva Equina i dati disponibili per la creazione di test specifici e innovativi non sono così abbondanti.

E' stato quindi creato un database, ad uso interno, che raccoglie informazioni dettagliate sui focolai di Anemia Infettiva Equina nel territorio italiano come progetto pilota per un database comunitario.

Il database, oltre ai dati anamnestici, ospita informazioni sul posizionamento geografico (coordinate GPS), e la possibilità di associare ad ogni focolaio di AIE ad una sequenza genomica del virus.

Tutte le informazioni convogliate in un unico luogo virtuale, dovrebbero facilitare la fruizione di tutti i soggetti coinvolti (dall'allevatore, al veterinario ai servizi sanitari e l'ambiente accademico) per l'individuazione di obiettivi comuni.

REFERENZE

- Baccam P.**, Thompson R.J., Li Y., Sparks W.O., Belshan M., Dorman K.S., Oaks J.L., Cornette J.L., Carpenter S., Subpopulations of equine infectious anemia virus coexist in vivo and differ in phenotype, *Journal of Virology* 77 (2003) 12122-12131;
- Ball J.M.**, Rushlow K.E., Issel C.J., Montelaro R.C., *Detailed mapping of the antigenicity of the surface unit glycoprotein of equine infectious anemia virus by using synthetic peptide strategies*, *Journal of Virology* 66 (1992) 732-742;
- Baus, E.**, Andris, F., Dubois, P.M., Urbain, J., Leo, O., 1996. *Dexamethasone inhibits the early steps of antigen receptor signalling in activated T lymphocytes*. *J. Immunol.* 156 (12) 4555–4561;
- Belshan M.**, Park G.S., Bilodeau P., Stoltzfus C.M., Carpenter S., *Binding of equine infectious anemia virus rev to an exon splicing enhancer mediates alternative splicing and nuclear export of viral mRNAs*, *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000) 3550-3557;
- Bolfa, P.F.**, Nolf, M., Cadore, J.L., Catoi, C., Archer, F., Dolmazon, C., Mornex, J.F., Leroux, C., 2013. *Interstitial lung disease associated with ELAV infection in horses*. *Veterinary Research*, 2013 Dec 1;44:113
- Brindley M.A.**, Maury W., *Endocytosis and a low-pH step are required for productive entry of equine infectious anemia virus*, *Journal of Virology* 79 (2005) 14482-14488;
- Campbell R.S.F.**, Robinson W.F., *The Comparative Pathology of the Lentiviruses*, *Journal of Comparative Pathology* 119 (1998) 333-395;
- Cappelli, K.**, Capomaccio, S., Cook, F.R., Felicetti, M., Marenzoni, M.L., Coppola, G., Verini-Supplizi, A., Coletti, M., Passamonti, F., 2011. *Molecular detection, epidemiology, and genetic characterization of novel european field isolates of equine infectious anemia virus*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 27–33;
- Capomaccio, S.**, Willand, Z.A., Cook, S.J., Issel, C.J., Santos, E.M., Reis, J.K., Cook, R.F., 2012. *Detection, molecular characterization and phylogenetic analysis of full-length equine infectious anemia (ELAV) gag genes isolated from Shackleford Banks wild horses*. *Veterinary Microbiology* 157, 320–332;
- Capomaccio, S.**, Cappelli, K., Cook, R.F., Nardi, F., Gifford, R., Marenzoni, M.L., Passamonti, F., 2012. *Geographic structuring of global ELAV isolates: A single origin for New World strains?* *Virus Res.* 163, 656–659. doi:10.1016/j.virusres.2011.11.011
- Carpenter S.**, Chesebro B., *Change in host cell tropism associated with in vitro replication of equine infectious anemia virus*, *Journal of Virology* 63 (1989) 2492-2496;
- Clabough, D.L.**, Gebhard, D., Flaherty, M.T., Whetter, L.E., Perry, S.T., Coggins, L., Fuller, F.J., 1991. *Immune-mediated thrombocytopenia in horses infected with equine infectious anemia virus*. *Journal of Virology* 65, 6242–6251;
- Cook R.F.**, Leroux C., C.J. Issel. 2013. *Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: A review* - *Veterinary Microbiology* 167 (2013) 181–204;

Cook, R.F., Cook, S.J., Li, F.L., Montelaro, R.C., Issel, C.J., 2002. *Development of a multiplex real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for equine infectious anemia virus (EIAV).* Journal of Virological Methods 105, 171–179;

Cook, R.F., Cook, S.J., Berger, S.L., Leroux, C., Ghabrial, N.N., Gantz, M., Bolin, P.S., Mousel, M.R., Montelaro, R.C., Issel, C.J., 2003. *Enhancement of equine infectious anemia virus virulence by identification and removal of suboptimal nucleotides.* Virology 313, 588–603;

Cook S.J., Cook R.F., Montelaro R.C., Issel C.J., et al, *Differential responses of Equus caballus and Equus asinus to infection with two pathogenetic strains of equine infectious anemia virus,* Veterinary Microbiology 79 (2001) 93-109;

Costa, L.R., Santos, I.K., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 1997. *Tumor necrosis factor-alpha production and disease severity after immunization with enriched major core protein (p26) and/or infection with equine infectious anemia virus.* Veterinary Immunology and Immunopathology 57, 33–47 ;

Craigo, J.K., Durkin, S., Sturgeon, T.J., Tagmyer, T., Cook, S.J., Issel, C.J., Montelaro, R.C., 2007. *Immune suppression of challenged vaccinates as a rigorous assessment of sterile protection by lentiviral vaccines.* Vaccine 25 (5) 834–845, January 15;

Craigo J.K., Sturgeon T. J., Cook S.J., Issel C.J., Leroux C., Montelaro R.C., *Apparent elimination of EIAV ancestral species in a long term inapparent carrier,* Virology 344 (2006) 340-353;

Craigo J.K., Zhang B., Tagmyer T.L., Cook S.J., Issel C.J., Montelaro C.J., *Envelope variation as a primary determinant of lentivirus vaccine efficacy,* Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. (PNAS) 104, 38 (2007) 15105-15110;

Craigo J.K., Barnes S., Cook S.J., Howe L., Issel C.J., Montelaro R.C., *An EIAV field isolate reveals much higher levels of subtype variability than currently reported for the equine lentivirus family,* Retrovirology 6:95 (2009) 1-12;

Craigo J.K., Barnes S., Montelaro R.C., *Characterization of an equine macrophage cell line: Application to studies of EIAV infection,* Veterinary Microbiology 136 (2008) 8-19;

Dahl C.P., Gullestad L., et al, *Increased expression of LIGHT/TNFSF14 and its receptors in experimental and clinical heart failure,* European Journal of Heart Failure 10 (2008), 352-359;

Damiani A., Ciabatti I.M., Cardeti G., Lorenzetti R., Scicluna M.T., Autorino G.L., Amaddeo D., 2005. *Development of a Real-Time PCR for the Differential Detection of Equine Herpesvirus Type 1 and Type 4.* 5th National Congress of the Italian Society of Virology (SIV) Orvieto (TR), September 19–21, pp. 115–116.

Decreto Ministeriale del 4 Dicembre 1976 *Profilassi dell'anemia infettiva degli equini;*

Decreto del Presidente della Repubblica 11 febbraio 1994, n. 243 *Regolamento recante attuazione della direttiva 90/426/CEE relativa alle condizioni di polizia sanitaria che disciplinano i*

movimenti e le importazioni di equini di provenienza dai Paesi terzi, con le modifiche apportate dalla direttiva 92/36/CEE;

Dong, J., Zhu, W., Cook, F.R., Goto, Y., Horii, Y., Haga, T., 2012a. *Identification of a novel equine infectious anemia virus (EIAV) field strain isolated from feral horses in Southern Japan.* Journal of General Virology 94 (Pt. 2) 360–365;

Dong, J.B., Zhu, W., Cook, F.R., Goto, Y., Horii, Y., Haga, T., 2012b. *Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses.* Archives of Virology 157, 2105–2111;

Friedman H., Specter S., Bendinelli M., *In vivo Models of HIV Disease and Control,* (2006) Springer Books;

Foil, L.D., Adams Jr., W.V., McManus, J.M., Issel, C.J., 1987. *Blood meal residues on mouthparts of Tabanus fuscicostatus (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens.* Journal of Medical Entomology 4, 613–616;

Foil L.D., Adams W.V., Issel C.J., *Observations of tabanid feeding on mares and foals,* American Journal of Veterinary Research, May (5) 46 (1985) 1111-1113;

Gendelman H.E., Narayan O., Molineaux S., Clements J.E., Ghotbi Z., *Slow persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow,* Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. (PNAS) 82 (1985) 7086-7090;

Goudsmit J., Houwers D.J., Smit L., Nauta M., *LAV/HTLV-III gag gene product p24 shares antigenic determinants with equine infectious anaemia virus but not with visna virus or caprine arthritis-encephalitis virus,* Intervirology 26 (1986), 169-173;

Grund C.H., Lechman E.R., Issel C.J., Montelaro R.C., Rushlow K.E., *Lentivirus cross-reactive determinants present in the capsid protein of equine infectious anemia,* Journal of General Virology 75 (1994) 657-662;

Hammond S.A., Li F., Cook S.J., Issel C.J., Montelaro R.C., *Immune responses and viral replication in long term inapparent carriers ponies inoculated with equine infectious anemia virus,* Journal of Virology 74 (2000) 5968-5981;

Hammond S.A., Cook S.J., Lichtenstein D.L., Issel C.J., Montelaro R.C., *Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process.* Journal of Virology 71 (1997) 3840-3852;

Harrold S.M., Cook S.J., Cook R.F., Rushlow K.E., Issel C.J., Montelaro R.C., *Tissue sites of persistent infection and active replication of equine infectious anemia virus during acute disease and asymptomatic infection in experimentally infected equids;* J. Virol. 74 (2000) 3112–3121;

Howe L., Leroux C., Issel C.J., Montelaro R.C., *Equine infectious anemia virus envelope evolution in vivo during persistent infection progressively increases resistance to in vitro serum antibody neutralization as a dominant phenotype,* Journal of Virology 76 (2002) 10588-10597;

- Howe H. et. al.**, 2005. *Specificity of serum neutralizing antibodies induced by transient immune suppression of inapparent carrier ponies infected with a neutralization-resistant equine infectious anemia virus envelope strain*. J. Gen. Virol. 86, 139–149;
- Hines, R., Maury, W.**, 2001. *DH82 cells: a macrophage cell line for the replication and study of equine infectious anemia virus*. J. Virol. Methods 95, 47–56.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F.**, 2001. MRBAYES: *Bayesian inference of phylogenetic trees*. Bioinformatics 17, 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Issel C.J., Adams W.V., McManus J.M., Montelaro R.C., et al**, *Efficacy of inactivated whole virus and subunit vaccines in preventing infection and disease caused by equine infectious anemia virus*, Journal of Virology 66 (1992) 3398-3408;
- Issel C.J., Adams W.V., et al**, *Transmission of equine infectious anemia virus from horses without clinical signs of disease*, JAVMA 180 (1982) 272-275;
- Issel, C.J., Adams Jr., W.V.**, 1982. *Detection of equine infectious anemia virus in a horse with an equivocal agar gel immunodiffusion test reaction*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 276–278;
- Issel, C.J., Cook, R.F.**, 1993. *A review of techniques for the serologic diagnosis of equine infectious anemia*. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 137–141;
- Issel, C.J., Cook, S.J., Cook, R.F., Cordes, T.R.**, 1999. *Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV)*. J. Equine Vet. Sci. 19, 728–732;
- Issel, C.J., Scicluna, M.T., Cook, S.J., Cook, R.F., Caprioli, A., Ricci, I., Rosone, F., Craigo, J.K., Montelaro, R.C., Autorino, G.L.**, 2013. *Challenges and proposed solutions for more accurate serological diagnosis of equine infectious anaemia*. Vet. Rec. 172, 210, 2012-100735;
- Issel C.J., Cook S.J., Cook R.F., Cordes T.R.**, *6th World Congress of World Equine Veterinary Association: Optimal paradigms to detect reservoirs of equine infectious anemia virus (EIAV)*, Journal of equine veterinary science 11 (1999) 728-732;
- Issel C.J., Adams W.V.**, *Detection of equine infectious anemia virus in a horse with a equivocal agar gel immunodiffusion gel reaction*, Journal of the American Veterinary Medical Association (AVMA) 180 (1982) 276-278;
- Kono, Y., Hirasawa, K., Fukunaga, Y., Taniguchi, T.**, 1976. *Recrudescence of equine infectious anemia by treatment with immunosuppressive drugs*. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 16, 8–15;
- Langemeier J.L., Cook S.J., Cook R.F., Rushlow K.E., Montelaro R.C., Issel C.J.**, *Detection of Equine Infectious Anemia Viral RNA in Plasma Samples from recently infected and long-term inapparent carrier animals by PCR*, Journal of Clinical Microbiology, June 1996, 1481-1487;
- Leroux C., Cadore J.L., Montelaro R.C.**, *Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us?*, Vet. Res. 35 (2004) 485-512;
- Sellon D.C.**, *Equine Infectious Anemia*, Veterinary Clinics of North America-Equine Practice, Vol 9 n.2 (1993) 321-336;

Leroux C., Craigo J.K., Issel C.J., Montelaro R.C., *Equine Infectious Anemia Virus Genomic Evolution in Progressor and Nonprogressor Ponies*, Journal of Virology, May 2001 4570-4583;

Li, H., Durbin, R., 2009. *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinforma. Oxf. Engl. 25, 1754–1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324

Lignee, M., 1843. *Memoire et observations sur ure maladie de sarg, connue sous le nom d'anemie hydrohemie. Cachexie aqueuse du cheval*. Recueil de Medecine Veterinaire 20, 30;

Maury W., Thompson R.J., Jones Q., Bradley S., Baccam P., Smazik M., Oaks J.L., *Evolution of the Equine Infectious Anemia Virus Long Terminal Repeat during the Alteration of Cell Tropism*, Journal of Virology 79 (2005) 5653-5664;

McConnell S., *Transmission of equine infectious anemia virus from a horse negative to agar gel immunodiffusion test*, Equine Veterinary Journal 13 (1981) 123-126;

McConnico R.S., Issel C.J., Cook S.J., Cook R.F., Floyd C., Bisson H., *Predictive methods to define infection with Equine infectious anemia virus in foals out of reactor mares*, Journal of equine veterinary science 20 (2000) 387-392;

Mealey R.H., Fraser D.G., Oaks J.L., McGuire T.C., *Immune reconstitution prevents continuous equine infectious anemia virus replication in an Arabian foal with severe combined immunodeficiency: Lessons for control of lentiviruses*, Clinical Immunology 101 (2001) 237-247;

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytzky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., DePristo, M.A., 2010. *The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data*. Genome Res. 20, 1297–1303. doi:10.1101/gr.107524.110

Montelaro R.C. et al, *A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A. (PNAS) 102, 28 (2005) 9918-9923;

Montelaro R.C., Parekh B., Orrego A., Issel C.J., *Antigenic Variation during persistent infection by equine infectious anemia virus*, the journal of biological chemistry, Vol. 259 n.16 (1984) 10539-10544;

More, S.J., Aznar, I., Bailey, D.C., Larkin, J.F., Leadon, D.P., Lenihan, P., Flaherty, B., Fogarty, U., Brangan, P., 2008a. *An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: investigation methodology, initial source of infection, diagnosis and clinical presentation, modes of transmission and spread in the Meath cluster*. Equine Veterinary Journal 40, 706–708;

More, S.J., Aznar, I., Myers, T., Leadon, D.P., Clegg, T.A., 2008b. *An outbreak of equine infectious anaemia in Ireland during 2006: the modes of transmission and spread in the Kildare cluster*. Equine Veterinary Journal 40, 7 (2008) 709-711;

More, S.J., Brangan, P., Aznar, I., Bailey, D.C., Larkin, J., Myers, T., Leadon, D.P., Lenihan, P., Flaherty, B., Clegg, T.A., 2008c. *Successful eradication of equine infectious anemia from Ireland*

during 2006. In: Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. pp. 306–307;

Nagarajan, M.M., Simard, C., 2001. *Detection of horses infected naturally with equine infectious anemia virus by nested polymerase chain reaction*. Journal of Virological Methods 94, 97–109;

Newman M., Issel C.J., Horohov D.W., Montelaro R.C., *Transient suppression of equine immune responses by equine infectious anemia virus (EIAV)*, Virology 184 (1991) 55-66;

Oaks J.L., McGuire T.C., Ulibarri C., Crawford T.B., *Equine Infectious Anemia Virus is found in tissue macrophages during subclinical infection*, Journal of Virology 72 (1998) 7263-7269;

Oaks J.L., McGuire T.C., Ulibarri C., Crawford T.B., *Endothelial cell infection in vivo by equine infectious anaemia virus*, Journal of General Virology 80 (1999) 2393-2397;

Oaks J.L., Long M.T., Baszler T.V., *Leukoencephalitis associated with selective viral replication in the brain of a pony with experimental chronic equine infectious anemia virus infection*, Veterinary Pathology, 41 (2004) 527-532;

OIE, 2013a. *Equine Infectious Disease*. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th edition, pp. 866–870 (Chapter 2.5.6);

OIE, 2012b. *Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious disease*. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 7th edition, pp. 1–8 (Chapter 1.1.5);

Orrego A., Issel C.J., Montelaro R.C., Adams W.V., *Virulence and in vitro growth of a cell-adapted strain of equine infectious anemia virus after serial passage in ponies*, American Journal of Veterinary Research (AVMA) 43 (1982) 1556-1560;

Parker, J., Rambaut, A., Pybus, O.G., 2008. *Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty*. Infect. Genet. Evol. 8, 239–246.

Payne S.L., Fagerness A., Fuller F.J., *Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus*, Journal of Virology 78 (2004) 2478-2485;

Pearson, J.E., Becvar, C.S., Mott, L.O., 1971. *Evaluation of the immunodiffusions test for the diagnosis of equine infectious anemia*. Proceedings of the US Animal Health Association 74, 259–267

Perry S.T., Flaherty M.T., et al., *The surface envelope protein gene region of equine infectious anemia virus is not an important determinant of tropism in vitro*, Journal of Virology 66 (1992) 4085-4097;

Perryman L.E., O'Rourke K.I., McGuire T.C., *Immune responses are required to terminate viremia in equine infectious anemia lentivirus infection*, J. Virol. 62 (1988) 3073– 3076.

Quinlivan, M., Cook, R.F., Cullinane, A., 2007. *Real-time quantitative RTPCR and PCR assays for a novel European field isolate of equine infectious anaemia virus based on sequence determination of the gag gene*. *Vet. Rec.* 160, 611–618;

Russell K.E., Perkins P.C., Hoffman M.R., Miller R.T., Walker K.M., Fuller F.J., Sellon D.C., *Platelets from thrombocytopenic ponies acutely infected with equine infectious anemia virus are activated in vivo and hypofunctional*, *Virology*, 259 (1999) 7-19;

Russell K.E., Walker K.M., Miller R.T., Sellon D.C., *Hyperglobulinemia and lymphocyte subset changes in naturally infected, inapparent carriers of equine infectious anemia virus*, *American Journal of Veterinary Research (AVMA)* 59 (1998) 1009-1015;

Rwambo P.M., Adams W.V., Issel C.J., Hussain K.A., Montelaro R.C., *EIAV: Humoral responses of recipient ponies and antigenic variation during persistent infection*, *Archives of Virology*, 111 (1990) 199-212;

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY;

Sciocluna M. T., Zini M., Caprioli A., Cordioli P., Vulcano G., Della Verita' F., Gregnanini S., Palmerini T., Simula M., Stilli D., Autorino G. L., 2008. *Equine infectious anemia: should the agar immunodiffusion test still be used for screening and as unique confirmatory test?* *Atti IX Congresso Nazionale SIDiLV*, Alghero, Italy, pp. 78–79;

Sellon D.C., Walker K.M., Russel K.E., Perry S.T., Covington P., Fuller F.J., *Equine infectious anemia virus replication is upregulated during differentiation of blood monocytes from acutely infected horses*, *Journal of Virology* 70 (1996) 590-594;

Sentsui H., Kono Y., *Complement-mediated hemolysis of horse erythrocytes treated with equine infectious anemia virus*, *Arch. Virol.*95 (1987) 53–66.

Shen T., Liang H., Tong X., Fan X., He X., Ma Y., Xiang W., Zhang X., Shao Y., *Aminoacid mutations of the infectious clone from Chinese EIAV attenuated vaccine resulted in reversion of virulence*, *Vaccine* 24 (2006) 738-749;

Sparks W.O., Dorman K.S., Carpenter S., Liu S., *Naturally arising point mutations in non-essential domains of equine infectious anemia virus Rev alter Rev-dependent nuclear-export activity*, *Journal of General Virology* 89 (2008) 1043-1048;

Spyrou, V., Papanastassopoulou, M., Psychas, V., Billinis, C., Koumbati, M., Vlemmas, J., Koptopoulos, G., 2003. *Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies*. *Vet. Microbiol.* 95, 49–59.

Stephens R.M., Casey J.W., Rice N.R., *Equine Infectious anemia virus gag and pol genes relatedness to visna and AIDS virus*, *Science* 321 (1986) 589-594;

Sun C., Montelaro R.C., et al., *Binding of equine infectious anemia virus to equine lentivirus receptor-1 is mediated by complex discontinuous sequence in the viral envelope gp90 protein*, *Journal of General Virology* 89 (2008) 2011-2019;

Tashjian R.J., *Transmission and clinical evaluation of an equine infectious anemia herd and their offspring over a 13-year period*, Journal of the American Veterinary Medical Association, Feb (3) 184 (1984) 282-8;

Taylor, S.D., Leib, S.R., Carpenter, S., Mealey, R.H., 2010. *Selection of a rare neutralization-resistant variant following passive transfer of convalescent immune plasma in equine infectious anemia virus-challenged SCID horses*. Journal of Virology 84, 6536–6548;

Tornquist S.J., Oaks J.L., Crawford T.B., *Elevation of cytokines associated with the thrombocytopenia of equine infectious anaemia*, Journal of General Virology 78 (1997) 2541-2548;

Tumas, D.B., Hines, M.T., Perryman, L.E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1994. *Corticosteroid immunosuppression and monoclonal antibody-mediated CD5+ T lymphocyte depletion in normal and equine infectious anemia virus-carrier horses*. J. Gen. Virol. 75, 959–968;

Vallee, H., Carre, H., 1904. *Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 139, 331–333;

Williams, D.L., Issel, C.J., Steelman, C.D., Adams, W.V.J., Benton, C.V., 1981. *Studies with equine infectious anemia virus: transmission attempts by mosquitoes and survival of virus on vector mouthparts and hypodermic needles, and in mosquito tissue culture*. American Journal of Veterinary Research 42, 1469–1473;

Divulgazione dei risultati della ricerca.

I dati preliminari ottenuti dalle attività svolte nell'ambito del progetto di ricerca sono stati analizzati e pubblicati su riviste scientifiche internazionali impattate:

1. ***Is A Diagnostic System For Equine Infectious Anaemia Based Exclusively On Agar Gel Immunodiffusion Adequate For Controlling The Spread Of This Infection?*** M.T. Scicluna, C.J. Issel, R.F. Cook, G. Manna, A. Cersini, R. Frontoso, A. Caprioli, F. Rosone. and G.L. Autorino *Vet. Microbiol*, 2013 Jul 26;165(1-2):123-34
2. ***Challenges And Proposed Solutions For More Accurate Serological Diagnosis Of Equine Infectious Anaemia*** Issel Cj, Scicluna Mt, Cook Sj, Cook Rf, Caprioli A, Ricci I, Rosone F, Craigo Jk, Montelaro Rc, Autorino Gl. *Veterinary Record*, 2013 Feb 23;172(8)
3. ***Dynamics Of Equine Infectious Anemia Virus Infection In Naturally Infected Mules*** G.L. Autorino, C.J. Issel, R.F. Cook, M.T. Scicluna, G. Manna, A. Cersini, R. Frontoso, A. Caprioli, and F. Rosone. *Jour. Equine Vet. Science* , 2012, **10**, Vol 32
4. ***What Feedback After Five Years From The Implementation Of The Italian National Surveillance Programme For Equine Infectious Anemia (Eia)*** M. Sala, G. Ferri, M.T. Scicluna, P. Scaramozzino, I. Ricci, R. Nardini, L. Ruocco, M. Paglialunga, R. Forletta, G.L. Autorino. G. Manna, G. L. Autorino, *Jour. Equine Vet. Science* , 2012, **10**, Vol 32

Infine, alcuni risultati della ricerca sono stati presentati nell'ambito di uno specifico convegno internazionale *“Attualita' e Prospettive Di Controllo A Sei Anni Dalla Sorveglianza Pianificata”*, tenutosi il 1 ottobre 2012 a Roma presso il Ministero della Salute, cui sono intervenuti oltre 250 veterinari pubblici e libero professionisti operanti nel settore, nonché ricercatori italiani e provenienti da 7 Paesi europei, e nel corso della giornata *“Malattie da Retrovirus sottoposte a sorveglianza: aggiornamenti epidemiologici e strumenti diagnostici”* tenutasi a Roma il 14 Aprile 2015, presso la Sala Tirreno della Regione Lazio.

Il Responsabile scientifico

Dr. Gian Luca Autorino



ALLEGATO 1

NOTA Accanto ad ogni sequenza è indicato tra le parentesi il protocollo utilizzato per ottenere il sequenziamento degli amplificati.

a) (PCR Cappelli), i primer impiegati sono:

EIAV 2F: 5'-TGTGGGCGCTAAGTTTGGTG-3'

EIAV 2R: 5'-TTTCTGTTTCCAGCCCCATC-3'

Referenza

Molecular Detection, Epidemiology, and Genetic Characterization of Novel European Field Isolates of Equine Infectious Anemia Virus

K. Cappelli, S. Capomaccio, F. R. Cook, M. Felicetti, M. L. Marenzoni, G. Coppola, A. Verini-Supplizi, M. Coletti and F. Passamonti.

Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2011 Volume 49; N°1: pp.27-33

b) (PCR Dong), i primer impiegati sono:

EIAVvan 2F: 5'-ATTCTGCGGTCTGAGTCCCT-3'

EIAVvan 2R: 5'-TAAGTTCTCCTCTGCTGTCC-3'

Referenza

Development of a nested PCR assay to detect equine infectious anemia proviral DNA from peripheral blood of naturally infected horses.

Dong JB, Zhun W, Cook FR, Goto Y, Horii Y, Haga T.

Arch. Virol. 2012 Nov; 157(11):2105-11. doi: 10.1007/s00705-012-1406-8. Epub 2012 Jul 14.

Tabella n.1: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number GQ996590.1; Equine infectious anemia virus strain 109-09 5' UTR, Austria. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
9041972	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	91% GQ996590.1	Frosinone (Associazione Provinciale allevatori Frosinone)	Cavallo	2009
9023030	<i>Milza</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	92% GQ996590.1	Anagni (Mattatoio Anagni)	Cavallo	2009

09041972 EIAVvanF (PCR Dong)

TCAGCCTCATAATATAATTCTCTACCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTTGTTCTGATCTTAAGACCC
AACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGGCTGA
TCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

09041972 EIAVvanR (PCR Dong)

AATAGGCCAGGTTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCAAGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGT
TGGGTCTTAAAGATCAGAACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTTATTGAG
GCTTTGTAAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAAT

09023030 EIAVvanF (PCR Dong)

GCATGGGCCTAAATAATAAATAATTCTCTGCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTTGTTCTGTTCTT
AAGACCTAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCCGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACC
TGGCTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

09023030 EIAVvanR (PCR Dong)

AACGCCAGTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCGGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACT
GTTAGGTCTTAAAGAACAACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGCAGAGAATTATATTT
ATTATTTAGGCTTTATAAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAAT

Nel caso del campione 9023030 anche il campione Leucociti/Plasma è risultato **debole positivo** alla PCR Cappelli, però non è stato sequenziato a causa della scarsa quantità in DNA.

Tabella n.2: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number HQ888862.1; Equine infectious anemia virus isolate Ita90 gag protein, Italia. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
10012351	<i>Milza</i>	Positivo PCR Cappelli Negativo PCR Dong	98% HQ888862.1	Firenze (Azienda Sanitaria Fiorentina a Sud-Est)	Cavallo	2010

13012351 milza EIAV 2F FL. 138-13 (PCR Cappelli)

CCCCTATTTTTGTGAGGAGAGGACTGGCAATTAAGGGACGTCATACCATTGCTGGAGGACGTTA
CCCAGGCATTGTCAGGGCAAGAGAGAGACGCTTTTGAGAAAACATGGTGGGCAATATCAGCAG
TAAAAATGGGTCTACAAATAAATCATGTAGGCGACGGTAAAGCTTCCTTTCAGCTGTTAAAGGC
AAAACATGAAAGAAAGGATAGCTCTAAGAAGCAATCTGAGCCCCATGAGGAATATCCAATTAT
AATAGATGGGGCTGGAAACAGAAAA

13012351 milza EIAV 2R FL. 138-13 (PCR Cappelli)

CTATTCCTCAATGGGGGCTAAGATTGCTTCTTAGAGCTATCCTTTCTTTCATGTTTTGCCTTTAAC
AGCTGAAAGGAAGCTTTACCGTCGCTACATGATTTATTTGTAGACCCATTTTACTGCTGATAT
TGCCACCATGTTTTCTCAAAGCGTCTCTCTTGGCCCTGACAATGCCTGGGTAACGTCCTCCA
GCAATGGTATGACGTCCCTTAATTGCCAGTCCTTCTCCTTCACAAAATTAGTCTCGTGGAATAA
ATCCACCAAACCTTAGCGCCCAAA

Nel caso del campione 12012351 anche il campione Leucociti/Plasma è risultato **debole positivo** alla PCR Dong, però non è stato sequenziato a causa della scarsa quantità in DNA.

Tabella n.3: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number JX003259; Equine infectious anemia virus strain Miyazaki 2011-65 gag protein gene, partial cds, Giappone. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
09037268	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	90% JX003259.1	Avezzano (ASL 1 Avezzano-Sulmona)	Mulo	2009

09037268 EIAV van Forw (PCR Dong)

ATCGGGCCTCATATAATATAATTCTCTACCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTTGTCTTGATTTTAAAG
ACCCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCCGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGG
CTGATCATAGGATCTCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

09037268 EIAV van Rev (PCR Dong)

CCCGCAGGTTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCGGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTTGG
GTCTTAAAATCAAGACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTATTATTGAG
GCTTTGTAAGCCAGCTGAGAAGGGACTCAGACCCGAGAATA

Tabella n.4: campioni che presentano omologia di sequenza con sequenza Accession Number JQ627103.1; Equine infectious anemia virus isolate SLO-14 5' UTR; and gag protein (gag), partial cds, Slovenia. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
21485	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	97% JQ627103.1	/	/	2008

21485 EIAV van Forw. (PCR Dong)

GGTGGGCCTTTTTATAATATAATTCTCTGCTCAGTCCCTGCTTCCAACCTTGTCTTGTTTTCAAGAT
CCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAAGGGCGCAGACCCTACCTGCTGAACCTGGCT
GATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

21485 EIAV van Rev. (PCR Dong)

CTCGCCAGTTCGCAGGTAGGGTCTGCGCCCTTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTAGGA
TCTTGAAAACAAGACAAGTTGGAAGCAGGGACTGAGCAGAGAATTATATTATTATAAAAAGGC
CTTTTCAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCCGAGAATA

Tabella n.5: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number GQ996596.1; Equine infectious anemia virus strain 467-09 5' UTR; and gag protein gene, partial cds,

Austria. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
13959	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Debole Positivo PCR Cappelli	85% GQ996596.1	Rieti (ASL10 Poggio Mirteto)	Cavallo	2009
9069098	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	95% GQ996596.1	Latina (Maenza)	Cavallo	2009
26021	<i>Milza</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	95% GQ996596.1	Colleferr o	Cavallo	2009
29075	<i>Fegato</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	96% GQ996596.1	Latina	Cavallo	2008

13959 EIAVvan F FL.114-13 (PCR Dong)

TTTAAGCCTTGAATAAATAAATTCTCTATTTCAGGTCCTGTTTCATAACTTGTCTTATTTTTGGA
CAACCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAGGGCGTAGACCCTGTCTGCTGAACCTGGC
TGATCGTAAGATCTTTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

13959 EIAVvan F FL.114-13 (PCR Dong)

ACAGAACAGGGTTCAGCAGACAGGGTCTACGCCCTTCAGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTTGG
TTGTCCAAAATAAGACAAGTTATGAACAGGACCTGAATAGAGAATTATATTTATTTTCAAGGC
TTATTTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAAT

Nel caso del campione 13959 è stato sequenziato il prodotto della PCR ottenuto con il protocollo PCR Dong.

09069098 EIV van F FL.114-13 (PCR Dong)

GATCAAGCCTTGAATAAATAAATTCTCTGTTTCAGTCCCTGTTTCCAACCTGTTTTGTTTTAA
GATCCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACTGAGAAGGGCGCAGACCCTACCTGCTGAACCTG
GCTGATCGTAAGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

09069098 EIV van R FL.114-13 (PCR Dong)

ATCACAGGTTTCGCAGGTAGGGTCTGCGCCCTTCTCAGGTCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTTGGA
TTTTAAAACAAAACAAGTTGAAAACAGGGACTGAACAGAGAATTATATTTATTTTCAAGGCTTG
ATTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAAT

26021 milza EIAVvan 2F (PCR Dong)

GCACGGGCCTTAGAATAAATAAATTCTCTGTTTCAGTCCCTGTTTCCAACCTGTTTTATTTTCAAG
TCCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACTGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGGC
TGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAAA

26021 milza EIAVvan 2R (PCR Dong)

AATCAGCAGTTTCGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCAGGTCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTTGG
ACTTGAAAATAAAAACAAGTTGAAAACAGGGACTGAACAGAGAATTATATTTATTTTCAAGGCT
TGATTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATAA

29075 fegato EIAVvan 2F (PCR Dong)

GAAGGCCTTGAGATAATATAATTCTCTGCTCTGTCCTGTTTCCACCTTGTCTTGTGTTTCAAGAT
 CCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGGCT
 GATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

29075 fegato EIAVvan 2R (PCR Dong)

AACAGCAAGATCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCAGGTCCTGTTCCGGGCGCCAACTGTAG
 GATCTTGAAAACAAGACAAGGTGGAAACAGGGACAGAGCAGAGAATTATATTATTCTCAAGG
 CTTATTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATA

Tabella n.6: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number GQ996594.1; Equine infectious anemia virus strain 274-09s 5'UTR; and gag protein gene, partial cds, Austria. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
21482	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	94% GQ996594.1	Frosinone	Cavallo	2008
31791	<i>Milza</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	97% GQ996594.1	Aquila (Oricola)	Cavallo	2008
10046 portogallo	<i>Milza</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	90% GQ996594.1	Roma Agriquestre Selva Nera ASL5 Roma E	Cavallo	2009
09069099	<i>Milza/Fegato</i>	Positivi PCR Dong Negativi PCR Cappelli	91% GQ996594.1	Terni	Cavallo	2009

21482 EIAVvan F FL.114-13 (PCR Dong)

CTCAGGCTTTTATATAATATAATTCTCTGCTCCGTCCTGCTTCCACTTGTGTTTTCAGAACC
 TACCGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAAAGGGCGCAAACCCTACCTGCTGAACCTGGCTGA
 TCCTAAGATCCCTAAGACAGCAGAAGAAAACCTTAAA

21482 EIAVvan F FL.114.13 (PCR Dong)

TTAGGCTTTTATATAATATAATTCTCTGCTCAGTCCCTGCTTCCAACCTTGTCTTGTGTTTTC
 AAGATCCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAAGGGCGCAGACCCTACCTGCT
 GAACCTGGCTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

31791 milza EIAVvan 2F (PCR Dong)

CAGAACTTCTTATAATATAATTCTCTGCTCAGTCCCTGTGTTCAACTTGTCTTGTGTTTCAAGATC
 CTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGGCTG
 ATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAAA

31791 milza EIAV van 2R (PCR Dong)

ATCGCAGGTTAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGTAGGA
TCTTGAACAAGACAAGTTGAACACAGGGACTGAGCAGAGAATTATATTTATTAAGAAGGCTC
TTAGCCCAGCTGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATA

10046 portogallo milza EIAV van 2F (PCR Dong)

CTAAGGGCCTCATAATAATATAATTCTCTACCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTTGTCTGATTTTA
AGACCCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCCGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCT
GGCTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAAAATTCTTCTGGAGTGTCTCTGA

10046 portogallo milza EIAV van 2R (PCR Dong)

TCAGCCAGGTTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCGGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGTTG
GGTCTTAAAATCAGAACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTTATTATTGA
GGCTTTGTAAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATA

09069099 milza EIAV van 2F (PCR Dong)

ATTAAGCCTTAATAAATAATTAATTCTCTACCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTTGTCTGATTTTAAG
ACTCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCCGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGG
CTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

09069099 milza EIAV van 2R (PCR Dong)

TTCCGGCAAGGTTAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCGGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGTT
GAGTCTTAAAATCAGAACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTTATTGAGG
CTTTGTAAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATA

09069099 fegato EIAV van 2F (PCR Dong)

GCAGGCCTCAATAAATAATTAATTCTCTACCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTTGTCTGATTTTAAGA
CTCAACAGCTGGCGCCCGAACAGGGACCCGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGGC
TGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

09069099 fegato EIAV van 2R (PCR Dong)

TTCTGCCAGTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCGGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAGCTGTTG
AGTCTTAAAATCAGAACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTTATTGAGGC
TTTGTAAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATA

Tabella n.7: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number JX003262.1; Equine infectious anemia virus strain Miyazaki 2011-75 gag protein (gag) gene, partial cds; Giappone. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
9018417	<i>Leucociti/Plasma</i>	Positivo PCR Dong Debole Positivo PCR Cappelli	84% JX003262.1	Aquila (Tagliacozzo)	Cavallo	2009

09018417 EIAV van F FL. 114-13 (PCR Dong)

GTAAACCTCATAAAAATAATTAATTCTCTACCTTGAGTCCCTGGGCTTAACTTGGTCTGGTTTTAAGAA
CTTACCGTTGGCGCCCAACCGGGACCCAAAAGGGCGCCAAACCTTGCTGGTGAACCTGGGT
GATCCTAGGATCCCTAAGACAGCAGAAGAAAACCTTAAA

09018417 EIAV van R FL. 114-13 (PCR Dong)

ATCCGCAGGTTTCGCAGGTAGGGTCTGCGCCCTTCTCGTGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGTTAG
GTCTTAAAACAGAACAAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTTATTGAGGCT
TTGGAAGCCCCGCAAAAAGGGACTCCAAACGCAAAAATA

Nel caso del campione 9018417 è stato sequenziato il prodotto della PCR ottenuto con il protocollo PCR Dong.

Tabella n.8: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number JX003263.1; Equine infectious anemia virus strain Miyazaki2011-A, complete genome; Giappone. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
9069097	<i>Polmone</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	85% JX480652.1	Anagni (Mattatoio Anagni)	Cavallo	2009

09069097 polmone EIAV van 2F (PCR Dong)

TCCAGCCGTTTCGCAGGTAGGGTCTGTGCCCTTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTTGG
ATCTTAAAACAAAACAAGTTGGAACAGGGACTGAACAGAGAATTATATTTATTTTCAAGGCTT
GATTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATAAA

09069097 polmone EIAV van 2R (PCR Dong)

TCCAGCCGTTTCGCAGGTAGGGTCTGTGCCCTTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTTGG
ATCTTAAAACAAAACAAGTTGGAACAGGGACTGAACAGAGAATTATATTTATTTTCAAGGCTT
GATTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATAAA

Nel caso del campione 9069097 il campione Leucociti/Plasma è risultato **debole positivo** alla PCR Cappelli, però non è stato sequenziato a causa della scarsa quantità in DNA.

Tabella n.9: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number JQ627096.1; Equine infectious anemia virus isolate SLO-17 5' UTR; and gag protein (gag) gene, partial cds; Slovenia. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità-Sequenza	Origine	Razza	Anno
26020	<i>Polmone/Milza</i>	Positivi PCR Dong Negativi PCR Cappelli	97% JQ627096.1	Fiamignano (Roma)	Cavallo	2008

26020 milza EIAV van 2F (PCR Dong)

TCATGGCCTTGGGGATAATATATAATTCTCTACTCAGTCCTTGTTCCTCAACTTGTCTTGT
TTTCAAGACCCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTGCC
TGCTGAACCTGGCTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAAA

26020 milza EIAV van 2R (PCR Dong)

AACCACCCAGGTTTCGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCA
ACTGTTGGGTCTTGAAAACAAGACAAGTTGGAAACAAGGACTGAGTAGAGAATTATAT
ATTTATTCTCAAGGCTATTTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAAT

26020 polmone EIAV van 2F (PCR Dong)

GCCAGGCTTGAGATAATATATAATTCTCTACTCAGTCCTTGTTCCTCAACTTGTCTTGT
TTTCAAGACCCAACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGG
CTGATCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTAA

26020 polmone EIAV van 2R (PCR Dong)

ATAAGGCCGTTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACTGTT
GGGTCTTGAAAACAAGACAAGTTGGAAACAAGGACTGAGTAGAGAATTATATATTTATTCTCA
AGGCTATTTAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAAT

Tabella n.10: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number GQ996593.1; Equine infectious anemia virus strain 273- 09L; and gag protein (gag) gene, partial cds; Austria. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
10046 piccolo	<i>Milza</i>	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	89% GQ996593.1	Roma Agriquestre Selva Nera ASL5 Roma E	Cavallo	2009

10046 piccolo milza EIAVvan 2F (PCR Dong)

GTAAGGCCCTCAATAATAAATAATTTCTCTACCTTGAGTCCCTGGTCTTAACTGTTTTGACCC
AACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACAAGAGAAGGGCGCAGACCCTGCCTGCTGAACCTGGCTGA
TCGTAGGATCCCTAGGACAGCAGAGGAGAACTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTTTCTA

10046 piccolo milza EIAVvan 2R (PCR Dong)

AATAGGCAAGGTTTCAGCAGGCAGGGTCTGCGCCCTTCTCTTGTCCCTGTTCCGGGCGCCAACTGT
TGGGTCAAACAAGTTAAGACCAGGGACTCAAGGTAGAGAATTATATTATTATTGAGGCTTTG
TAAGCCCAGCAGAGAAGGGACTCAGACCGCAGAATA

Tabella n.11: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number KF878271.1; Equine infectious anemia virus isolate EIAVGER gag protein gene, partial cds; Germania. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
12051395	<i>Fegato</i>	Negativo PCR Dong Positivo PCR Cappelli	88% KF878271.1	Ginosa (Taranto)	Cavallo	2012
11044910	<i>Fegato</i>	Positivo PCR Cappelli Negativo PCR Dong	89% KF878271.1	Rieti	Cavallo	2011

12051395 fegato EIAV2F14-04-14-16.50 (PCR Cappelli)

CGCTTAACGCATGGCACCACTTTGTTAAAGAAAAAGACTGGCAATTGAGAGATGTCA
TTCCATTGCTGGAAGATGTCTCTCAAACATTAACAGGACAAGAAAAAGAGGCATTTGA
TAAAACATGGTGGGCGATTGCCGCTGAAAAATGGGCCTACAAATACAAAATGTACAT
GATGGAAAGGCATCATTTCATTGTTGAAAGCTAAATCTGAAAGAGTTACTAGTAAGA
AGAAGCCGCCAGAGCCTCAGGAAGAATATCCAATTATACTAGATGGGGCTGGAAACCC
CAC

12051395 fegato EIAV2R14-04-14-17.47 (PCR Cappelli)

GTACTACAATTGGAATTCTTCCTGAGGCTCTGGCTGCTTCTTCTTACTAGTAACTCTTTC
 ATATTTAGCTTTCAACAATTGAAATGATGCCTTTCCATCATGTACATTTTGTATTTGTAG
 GCCATTTTTACAGCGGCAATCGCCCACCATGTTTTATCAAATGCCTCTTTTTCTTGTCC
 TGTTAATGTTTGAGAGACATCTTCCAGCAATGGAATGACATCTCTCAATTGCCAGTCTT
 TTTCTTTAACAAAGTTGGTGTGCATGCATTAATCCACCAAACCTTAGCGCCCACA

11044910 fegato EIAV 2R_06_F10 (PCR Cappelli)

GATTCTTCTGGGGCTCTGGCTGCTTTTTTCTTACTAGCAGCCTTTTCATATTTAGCTTTCAACAATT
 GAAATGATGCCCTTCCATCGCCTACATTATTAATTTGTAGGCCCATCTTTACAGAGGCAATTGCC
 CACCATGTTTTCTCAAATGCATCTTTTTCTTGTCTGTAAATGTCTGAGAGACATCTTCCAGCAA
 TGGAAATGATATCTCTCAATTGCCAGTCTTTTTCTTTAGCAAAGTTGGTGTGCATGCATTAAGTCTA
 CCAAACCTTAGCGCCCACAA

Tabella n.12: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number KF878274.1; Equine infectious anemia virus isolate EIAVGER-2 gag protein gene, partial cds; Germania. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
11044910	<i>Milza</i>	Negativo PCR Dong Positivo PCR Cappelli	89% KF878274.1	Rieti	Cavallo	2011

11044910 MILZA EIAV 2F_07_G10 (PCR Cappelli)

GCAACTTTGTTAGAAAGACTGGCAATTGAGAGATATCATTCCATTGCTGGAAGATGTCTCTCAG
 ACATTAACAGGACAAGAAAAAGATGCATTTGAGAAGACATGGTGGGCAATTGCCGCTGTAAAG
 ATGGGTCTACAAATTAATAATGTAGGCGATGGAAGGGCATCATTTCAATTGTTGAGAGCTAAAT
 ATGAAAAGGCTGCTAGTAAGAAAAAGCAGCCAGAGCCCCAGGAAGAATATCCAATCGTAATA
 GATGGGGCTGGAAACAGAAAAGA

11044910 MILZA EIAV 2R_08_H10 (PCR Cappelli)

GATCTTCTGGAGCTCTGGCTGCTTTTTTCTTACTAGCAGCCTTTTCATATTTAGCTCTCAACAATTG
 AAATGATGCCCTTCCATCGCCTACATTATTAATTTGTAGACCCATCTTTACAGCGGCAATTGCC
 ACCATGTCTTCTCAAATGCATCTTTTTCTTGTCTGTAAATGTCTGAGAGACATCTTCCAGCAAT
 GGAATGATATCTCTCAATTGCCAGTCTTTTTCTTTAACAAAGTTGGTGTGCATGCATTAAGTCTAC
 CAAACTTAGCGCCCACAA

Tabella n.13: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number HM177438.1 ; Equine infectious anemia virus isolate 73 gag polyprotein (gag) gene, partial cds.; Italia. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

Campione	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
11044910	<i>Fegato</i>	Negativo PCR Dong Positivo PCR Cappelli	90% HM177438.1	Rieti	Cavallo	2011

11044910 fegato EIAV 2F_05_E10 (PCR Cappelli)

CAACTTTGCTAGAAAAGACTGGCAATTGAGAGATATCATTCCATTGCTGGAAGATGTCTCTCAG
 ACATTAACAGGACAAGAAAAAGATGCATTTGAGAAAACATGGTGGGCAATTGCCTCTGTAAAG
 ATGGGCCTACAAATTAATAATGTAGGCGATGGAAGGGCATCATTTCAATTGTTGAAAGCTAAAT
 ATGAAAAGGCTGCTAGTAAGAAAAAGCAGCCAGAGCCCCAGGAAGAATATCCAATCATAATA
 GATGGGGCTGGAAACAGAAAAA

11044910 MILZA EIAV 2R_08_H10 (PCR Cappelli)

GATCTTCTGGAGCTCTGGCTGCTTTTTCTTACTAGCAGCCTTTTCATATTTAGCTCTCAACAATTG
 AAATGATGCCCTTCCATCGCCTACATTATTAATTTGTAGACCCATCTTTACAGCGGCAATTGCC
 ACCATGTCTTCTCAAATGCATCTTTTTCTTGTCTGTTAATGTCTGAGAGACATCTTCCAGCAAT
 GGAATGATATCTCTCAATTGCCAGTCTTTTTCTTTAACAAAGTTGGTGTGCATGCATTAAGTCTAC
 CAACTTAGCGCCCAAA

Tabella n.14: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number NC_001450 ; Equine infectious anemia virus isolate Petropoulos gag polyprotein (gag) gene, partial cds.; Grecia. Per ogni campione è stato sequenziato il prodotto di PCR ottenuto da uno dei due protocolli di amplificazione selezionati.

<i>Campione</i>	Organi positivi	PCR Dong/PCR Cappelli	Identità - Sequenza	Origine	<i>Razza</i>	Anno
09038042	Fegato	Positivo PCR Dong Negativo PCR Cappelli	95% NC_001450	Latina	horse	2009

09038042 fegato EIAV van 2F (PCR Dong)

GTAAACATTTTATAAATATTATTCTCTACTCCGTCCTGGTTCCACTTGGCTTGGTTTCAGAACC
 CACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAAAGGGCGCAAACCTACCTGCTGAACCTGGGTGA
 TCCTAAGATCCCTAAGACAGCAAAAAGAAAACCTTAAA

09038042 fegato EIAV van 2R (PCR Dong)

ATCGACCGTTTCAGCAGGTAGGGTCTGCGCCCTTCTCAGGTCCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGTTG
 GATCTTGAAAACAAGACAAGTTGGAAGCAGGGACTGAGTAGAGAATTATTTATTATAAAAAG
 GCTCTTTAGCCCAGTAAAAAAGGGACTCCGACCGCAAAT

Tabella n.15: campioni che presentano identità di sequenza con sequenza Accession Number K247554.1; Equine infectious anemia virus isolate DE, partial cds; Italia

Campione	Organi positivi	Identità -Sequenza	Origine	Razza	Anno
Capomaccio Mulo n.4	<i>Plasma</i>	99% K247554.1	/	/	/

NOTA Questa sequenza è stata ottenuta mediante il sequenziamento della regione genomica relativa a *pol*.

Primer POL Roma Forward:

5'-GCCACTAAAGGCAGCACAAA-3'

Primer POL Roma Reverse:

5'-GATCTTGTAATAACCTCCATTTGCT-3'

Questi primer specifici per *pol* sono stati disegnati in IZSLT-U.S. Biotecnologie.

Mulo n.4 (PCR pol)

cgcagaccctacctgetgaacctggctgatcgtaggatccctaggacagcagaggagaacttacagacgtcttctggaggtgttctggccaga
 gcacaggaagacaggaatgatgggagaccagtgacatggagcaaaagcgtcaagaagttagagaagtgacgggtcaggggtctcaaaaa
 ttgaaagcgagtaattgtctgtggcgctaagttgggtgactactgcatgacaccaatttcagtaaaagaaaagactggcaattgagagatattc

ttcattgctggaagatgtctctcaaaccttgacaggacaagaaaaagaggcatttgagaaaacatgggtgggcaattgtgctgtaaagaagggc
ctacaaattgggcatgtaggcgatggaagggcaacatacaattgttaaaagcaaaatagaaagagctcctagtaagaacaacatccagagc
ctcaggaagaatatccaatcatgatagatggggctggaacagaaacttagaccattaacacccagaggatatactacctgggtaatactata
caacagaacaatctgttaaatgaagcaagtgtaaactgtttggatattatcagtagattgtacatctgaggaaatgaatgcatTTTTtagatgtggtgc
ctgggcagggcaggcaaaaagcaggtgttacttgacttattgaaaaagatagcacaagactgggataatgctcatcctttgccaaatgctccaatg
gtagcaccacctcaaggacgacagctagatttattaggggattaggagtaccaagagagagacaaatggaacctgctttgaccagtttagaca
aacgtataggcagtgattattgaagctatgacagaaggaatcaagataatgattgggaagccaaggctcaaaatattaggcaaggccctaaa
gagccttatccagactttgtagacagactattatcccaggtaaagagtggggacatccatcagaaatcactaaatTTTTgacagatactttgacat
tcaaaatgctaataagaatgtaagcagctatgagacacttaaggccagaagatactttagaggaaaaattatgcttgcagggatattggcac
cacgaaacagaaaatgatgttattggcaagagcgctcagagtggcttctggatcaatgaaaggtggaatatgtaaagggggccattaaag
gcacctcagacatgtataactgtggaaaaccaggacacttattagtcagtgtagggcacctaaagtgttttaagtcaaacagcctggacatt
ttcaaaagcaatgcagaaatgcgcaaaaaaacgggaaacaaggggctcaggggaggcccaaaaagcaaaccttcccatacagcagaaggg
tcagcaaatgacacaacaaggaggtccaaaggaaagtcaggggttatatccagatcactcaaatgaaacaggagtacaaactcgagaagaa
gagtcaggaagaggtagaggatctcaattgaaacagtttggggagtaacataatTTtagagaaaagacctaccacggtagtttaattaatgata
ctcccttaaatgtgctactagatacaggagcagatactcagtaactgttgcacattataataaataaaatatagaggggagaaaaatcaagga
acaggtattgtgggagttggaggaaatgtagaaacgttttactcctgtgacaataaagaaaaagggaaacagattaagactaggatgttagta
gcggatattccagtaactatctggggcgagatgttccaaagagttaggagcacaactgggtgatggcacaattgtctaaggaaatagttcctaga
aaaaaaaactaaagacaggcacaacagggcaaaaattcctcaatggccactcacaaagagaaattgtgggggctaaagaaatagttcaa
aggctattattagagggaataatctgagggcgaagacaataatccataatcacctatcttgaattaaaaagaaagctctggtaaatggaggt
attgcaagattgagagaattaaacaaaatgtagaattggaactgaaatatctaggggattacctcatctggaggtcaatcaaatgcaaca
aatgacagattggatattggggacgcatattcaccatacctttagatccagaatttagaccatacacagctttcactgttccatccataaatca
ggaaccagataaaaaggtacatatggaattgttgcacaaggttgttgaagtcacatacatatcaaaaagacattacaggaaatattacaagct
tcagagaaagacatagtgaagtacaattatcaatataatggatgattgtttattggcagcaatgttctaaaaaacacataaggaattagttaaag
aattaagagctattctttgaaaaaggtttgaaacgcctgatgataaattacaggaagagccacatataattgggttaggatcagctttgctctg
ataactggaaagtcaaaagatgcaattagagttagttaaagaaccaacacttaatgatgtcaaaaattaatgggcaatataacatggatgagtt
caggggtcccggattaacagtgaaacaaatagctgctaccactaaaggatgttagattaaatcaaaaagtaattggacaaggaagctcaaa
tagaattagaagaaaataatgagaaaataaaatgctcagggattgcattattataatccagaagaagaaacaatatgtgaattgaaattacaaa
aaattatgaggcaatctatataagtaagacaatcacaaaaaatcctgtgggcagggaaaaagatcatgagggctaaataaggtggctgcagcta
aaaatcaatgctattattacaacatgttgaacagagagtattactagaataggagtatgtccaaagtttaaggctacctttactaaagagcaagtca
tatgggaaatgcaaaaaggatggtattatgctgtggctccagaataatataatcctccaggtgttttgatgattgaaattaaattggtagaac
aaccaacatctggtatacaatftatacagatgggggaaaaacaaaacggagaaggaatagcggcgatataactagtaaagggaaaaaagaac
aaaagtgttgggacctgttactcatcagattgcagaaagaatagctatccagatggcattagaagatagtgaaagagaaacaataaacatagtaa
ctgatagttattattgtgaaaaatattacagaaggtttaggattagaaggtccagatagccctgggtggcctataatacagaacatcaaaactaaa
gaagcaatttatttctgggtaccaggccacaaggaatataatgtaaatcaattggcagacgaagcaactaaatgtcagaagaaattatgttag
catatacaggtactcaaattagagagaaaagagacgaagatgcaggatttgactgtgtattcctcatgatatgatattacatacaggggaaacaa
aaattataccacagatgtaaaaatcaagtgcctcagcagagtttgatgggttactggttaaatcatctatggcaaaagcaaggattattaatcaat
ggaggtataattgatgagggtatacaggagaatacaggtattgtactaatattggaaaaataacataaaattagtagaagggcaaaaattt
gcacagtttaattttgcaacaccagtcaaacattagacaatcttggatgagaataaaacatctcaaagaggtgataaaggatttgggagta
ggaatttttggatagaaaatattcaggaagcccaagatgagcatgagaattggcatacatcaccaaagatattagcaaaaagacatgggctacc
gttagcggtagcaaaagcagataaccaggagtgccacattgtactaaacaaggatctgggctgaggtgtgtagtaagatctcctaatcatt
ggcaagcggattgcacacatttagacaataaaataatattgacatttggagtcacaaactcagggtacatacatgctacgctattggcaaaagaga
atgcattatgtacttattagccatctagaatgggcaagactatttctcaaaatcattgcatacagataatggtactaattttgtgctgacacagt
agaaaatttataaaatTTTacaagtgaacataccacagggataccctaccatccagaaagtcagggtattatagaagagctaataaggacattg
aaagaaaaaattcaaagtcatagatatactcagacattggaagcggccctagaactgtctcattacttgaacaaagggaggggaaagtagt
ggaggacaaactccatgggaagtgttattactaatcaagcacaagttatacatgatgaattactaatacaacaagcacaatctccaaaaaattt
gttttataaaatcctggagaacataattggaaagggcctactaggggtattgtgaaaggtgatggtgcagtggtgcaatgatgaaggtaaag
gaataattgccataccttacaaggactaaattattaataaggccaaattgagtattgttcaggaaactccaccagtcagttaccattgtcaactgt
gcttcttgagatcttgggaattgactacttggatccctcactgagaaagaagaacaacaaggaagaagcaactgcagcaggagaaacagc
ctaaatacctgctataaggttggfacagggggftaatatattgggattgttggtaagggggtaacatggtcagcatcgccttctatgggggaatcc

cagggggagtccaaaccctattgtgcagcaatcagaaccgaaagtaagggatcagaaaaaggattatgagatattcagccttactgttat
gatagcagttataaaaccgagatggctgaggggaagagactcaagataccaagaagaatgatcccgaagaagaagcaaaaggaaaagaag
aaaaaggaagaatgactggggaagattggatgtttatgttatgtttgtaggagctgctgggggaatactatgggtgatgaggggagcaccag
atgtacattatattgggttagtggcagtgagggaaggtaaatggttctgggatgacaaatgcaatagagtgcggggaacttttctggatgtag
accatttactaactattttagtataagacaaatagaagtatacatgcccgaacaataactgctacattgttaaatgcctatcacagagaagtaacata
catatataaaacatctgtgtggatagtgatcattgtcaggaatatgtatgtcaagccgtaaacatgactgatgggggtaatactctactataagca
taactgggaataggacagattattgggggtccgatggttggaatgtaatacaactgagaacgcaaaaaccatagtagtgcctataaatgaaatg
gtacaaatagacaatagctcctcctgggtccctaaaggatgtaatgagacatgggcaaggtaaaacaatgtcctgttgattgttatatggaattc
atccaataagactatgtgtacaaccaccatttttctgtgtaaaaaatgatagctccaatagtaattccagtaatgaccctaaagtaattgtggccat
caatattccttggatttttagaggacaacaaggcagtagtaactgaaggaggtgtactctacacagaacaagcattatcgtcactctattatgtt
caatacattgtgcctatcttataactgtagtttaactacacatcgtgtaataatgactccctcataagtgttattatgcatgaaccaggtaatctaca
atattttattgtgaacataaataacacaagtaaaataaataatgctagttgtatagttcaaaccttccgggattataggacaagctcatctagaattaccta
gaaaaataagagaatgcagaaccaggcttctcacactataattgactgtaaataataagacagaaatgcaagaatggcagttagtaaaacc
tcaggcattactctatactatactcttaggagtgaaaaggggttaataagacataagagagattttggctatctgctattgtagctgctattgtg
ctgctactgctattgctgctagctactaccatgctttacattgctttgactgaagctagcaaaatacaagatgtagtaaatcacgtaaatgtggaaa
acaactctcagtgtcacagaatgatggaaaaacaatcagtatactatgctatgattctcaaacacatgcagatgtccagttataaaagaa
aaacaacaagtagaagaacatttaattgagatgtatagaaagaaccacacattttgtcacacgggacatccctggaataattcatgggga
cttctaaatgactcaacacaatgggatacatgggtaggtgaaatggaaaagtacaatcaagacatataacaacgctacatattgccagaacaat
ttagaacaggccatgataacctcaatacactgatagtagcgaatttgaaaaatataatgggatcatattgcaattggattctctggattagg
agcctccataatcaaatatagtggttttaacatctatgtggtactaacctctatgcctaagctcctcagacacctcttgacaacgatgactggt
gctggatcctcggcagtcattactgaagagaaaactccatcacaacgtgcatcgcaagacgggactgggaccgggaccagtagacagagta
cacctagcagcgtgaacgatggctccgagggcaaatcagcagcagagacctcaagaacagctggagtggagaatcagaggagtaca
gcagtcggcgggaagcactacgaggcatcaaccaagaaattggagagagctcaatggactcggcagaccaaggagattactccaactttat
agctcaaacgtgaagaagacgctggggagaagaatccaagccaaggatccttaagcctggagattcaaaagcgaaggcggaaacatctatg
actgttgcaataggctcaagagggaaactctgctatccctgctgtggttccactatggcttttctggggactaataatcactgggacgttaat
aggctatggactcggggactgcaaaaataatcatgtttagtgagggttattctactgtcaattaactggttaagaaaaggacttgattatgttg
aaaaatgtaaatccaagcaaatctcatgttaaatgcttctacgatattagaaaaaaggggggaactgtgggattaataatgactactgt
aaaaagaaactgctgatgcttataacctcatgtaacctaaaaggctagctcaggttctaggaactaaactataataacctgtaagttcctcatt
atagttccgctttgtgacgcttaagttcctcaaaftacaatataaagcactgtattctgacactgggacactcaattctcggctgagtccttct
ctgctgggctaaaa

2. CAMPIONI CHE NON PRESENTANO IDENTITA' DI SEQUENZA

Campione	Organi positivi	Origine	Razza	Anno
09011398	<i>Polmone</i>	Subiaco	Cavallo	2009
12046192-2	<i>Leucociti</i>	Roma	Cavallo	2012
11057577	<i>Polmone</i>	Foggia (IZS Puglia e Basilicata Sezione di Foggia)	Cavallo	2011
11044910	<i>Linfonodo mediastinico</i>	Rieti	Cavallo	2011
11044910	<i>Linfonodo meseraico</i>	Rieti	Cavallo	2011
12000049	<i>Leucociti</i>	Matera (Stigliano)	Cavallo	2012
11052894	<i>Leucociti e Plasma</i>	Milano (Corbetta)	Cavallo	2011

12007321-1	Leucociti e Plasma	Foggia (Panni)	Cavallo	2012
11041695	Eritrociti	Grosseto (Gavorrano)	Cavallo	2011

13011398 polmone EIAV 2F FL.138-13 (PCR Cappelli)

GTGAAAAAAGGCAGCCTGTGATGACTGAACCCCAACAGTGTCTCACCCCGACCTGGCTGATCT
GGCCGCCCTGACCCATTCCCCAGGGGCCAGGCCACTGGGTGGACGGGACTGCCTTTGCCCTGCG
GGTGCTGGGCAGGGAGGTAAGGCTAGAGGTTGGCTGAGTTTAAAGCAAGATGCATTGTTGCTT
GGAAGGCCGCTGGCTCCAGGGCTGGGGGACCTCAGAGACCACCAGTGTAAAGCCCCTCAGTGGA
CGTGGAGTGAGACTCAGACCAGGGGGAGAAGTGATGGGGCTGGAAACAGAAAA

13011398 polmone EIAV 2R FL.138-13 (PCR Cappelli)

GTCGGGAGTCTCCTCCACGTCCACTGAGGGGCTTACACTGGTGGTCTCTGAGGTCCCCAGCCC
TGGAGCCAGCGGCCTTCCAAGCAACAATGCATCTTGCTTTAAACTCAGCCAACTCTAGCCTTA
CCTCCCTGCCAGCACCCGCAGGGCAAAGGCAGTCCCGTCCACCCAGTGGCCTGGCCCCTGGG
GAATGGGTTCAGGGCGGCCAGATCAGCCAGGTCGGGGTGAGGACACTGTTGGGGTTTCAGTCAT
CACAGGCTGCCCTCTCCATCTCACAGACCCACCAAACCTTAGCGCCCAAAAA

12046192-2 leucociti EIAV2F08 (PCR Cappelli)

GCCTGCTCCGTCTTGTTCTGTGTGCAACGGGAAGACACTGGATGGTTTTTCAGTGGGATGAGGCA
ACACGGGCTGATTTATGTTTTTAAAAACACCGGTGCAGTAACTCTGCGTTCAGTGTGGAGTGT
CACCGAGTGCTGTCTGTTGTCAGACGTTGGGCGGGCGCTGGGTGACAAGGTGACGAACAGCCA
TGCTGGTCTCTGCCCGCCCGGAGCTCACAGCCTCACGGGGTGGGGAGGGGATGTGACTAGATG
TGCTCAGTGCCATGTGCTCTATGTAAGGATGGGGCTGGAAACAGAAAACAG

12046192-2 leucociti EIAV2R08 (PCR Cappelli)

TCTACTAGCGCACATGGCACTGAGCACATCTAGTCACATCCCCTCCCCACCCCGTGAGGCTGTG
AGCTCCGGGCGGGCAGAGACCAGCATGGCTGTTCGTCACCTTGTACCCAGCGCCCGCCCAAC
GTCTGACAACAGACAGCACTCGGTGAACACTCCACACTGAACGCAGAGTTACTGCACCGGTGT
TTTTAAAAACATAAATCAGCCCGTGTTCCTCATCCACTGAAAACCATCCAGTGTCTTCCCCTT
GCACACAGAACAAGACGGAGCAGGGTCACCAAACCTTAGCGCCCAAAA

11057577 polmone EIAV2F (PCR Cappelli)

TTAGTGCGTATTAAGGGGAAGAAAACAAAGACAGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTC
GCAATAATCCTGTCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCAG
ACCCAGGTGAAAATGTTTCGCACCTTCCACCCATTTGTCCGGTACAGAGGTAACCTCGCTCTCT
GTGCCCCATTGCACTTGGTTCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCATGGAGAATTGGAACCTG
ACGTGTCTGCCTGTCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGT
CTCTGCATAACAGAGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATG
GATGATTGGATGGGGCCTGGAA

11057577 polmone EIAV2R (PCR Cappelli)

ATCTCTCCAATAATTGCTGAGCCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGC
AGAGACCAAAAAACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCATACTGCAGTGCAGGAGACAGGCAG
ACACGTCAGTTCCAATTCTCCGTGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCAAT
GGGGCACAGAGAGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTT
CACCTGGGTCCGGAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGAC
AGGATTATTGCGACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCATTCCTGTCTTTAGTTTTCTCCCCTTAAACC
CTTACCACCAACTTGCGGCCCAAAAA

12051392-2 polmone EIAV2F (PCR Cappelli)

CGGCGCGTATTAAGGGGAAGAAAACAAAGACAGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTC
GCAATAATCCTGTCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCGG
ACCCAGGTGAAAATGTTTCGCACCTTCCACCCATTTGTCCGGTACAGAGGTAACCTCGCTCTCT

GTGCCCCATTGCACTTGGTTCCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCCATGGAGAATTGGAAGTGC
ACGTGTCTGCCTGTCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGT
CTCTGCATAACCAGAGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATG
GATGATTGGATGGGGCTGAAAACAAGAAAAA

12051392-2 polmone EIAV2R (PCR Cappelli)

CTCTCCTCCAATAATTGCTGAGCCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGC
AGAGACCAAAAAACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAG
ACACGTCAGTTCCAATTCTCCATGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCAAT
GGGGCACAGAGAGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTT
CACCTGGGTCCGGAAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGAC
AGGATTATTGCGACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATA
CGCGTCACCACCAAACTTGCCGCCCAAAAAA

11044910 LINF MEDIAS EIAV 2F_03_C11 (PCR Cappelli)

GTGGGGGGAGAACTAAGACAGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTCGCAATAATCCTG
TCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCGGACCCAGGTGAAA
TGTTTCGCACCTTCTCACCCATTTGTCCGGTCACAGAGGTAACCTCGCTCTCTGTGCCCCATTGC
ACTTGGTTTCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCCATGGAGAATTGGAAGTACGCTGTCTGCCTG
TCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGTCTCTGCATAACCAG
AGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATGGATGATTGGATGG
GGCTGGAAACAGAAAA

11044910 LINF MEDIAS EIAV 2R_04_D11 (PCR Cappelli)

CAATTGGCTGAGCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGCAGAGACCAAAA
AACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAGACACGTCAGTT
CCAATTCTCCGTGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCAATGGGGCACAGAG
AGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTTACCTGGGTCT
GGAAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGACAGGATTATTGC
GACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATACGCGTCACCAC
CAAACCTAGCGCCCCAAAAA

11044910 LINF MES EIAV 2F_01_A11 (PCR Cappelli)

TAGGGGGAGAACTAAAGACAGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTCGCAATAATCCTGT
CCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCAGACCCAGGTGAAAT
GTTTCGCACCTTCTCACCCATTTGTCCGGTCACAGAGGTAACCTCGCTCTCTGTGCCCCATTGCA
CTTGGTTTCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCACGGAGAATTGGAAGTACGCTGTCTGCCTGT
CTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGTCTCTGCATAACCAG
AGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATGGATGATTGGATGG
GGCTGGAAACAGAAAA

11044910 LINF MES EIAV 2R_02_B11 (PCR Cappelli)

CATTTGCTGAGCCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGCAGAGACCAAAA
AACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAGACACGTCAGTT
CCAATTCTCCGTGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCAATGGGGCACAGAG
AGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTTACCTGGGTCT
GGAAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGACAGGATTATTGC
GACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATACGCGTCACCAC
CAAACCTAGCGCCCCAAAAA

1200049 leuc B.A. RIAV 2F_01_A09 (PCR Cappelli)

CTTTTGGTAGGAAACCTAAAGAAGGATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTCGCAATAATCCTG
TCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCGGACCCAGGTGAAA
TGTTTCGCACCTTCTCACCCATTTGTCCGGTCACAGAGGTAACCTCGCTCTCTGTGCCCCATTGC
ACTTGGTTTCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCCATGGAGAATTGGAAGTACGCTGTCTGCCTG
TCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGTCTCTGCATAACCAG

AGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATGGATGATTGGATGG
GGCTGGAAACAGAAAA

1200049 leuc B.A. RIAV 2R_02_B09 (PCR Cappelli)

CCTACGGCCTGGAGCCCATTTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGCAGAGACCAA
AAACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAGACACGTCAGT
TCCAATTCTCCATGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCAATGGGGCACAGA
GAGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTTACCTGGGTC
CGGAAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGACAGGATTATTG
CGACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATACGCGTCACCA
CCAAACTTAGCGCCCAAAAA

11052894 Banda alta EIAV-2F_07_G10 (PCR Cappelli)

TAAGGGGGGGAGAACTAAGACAGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTCGCAATAATCC
TGTCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCGGACCCAGGTGA
AATGTTTCGCACCTTCCTCACCCATTTGTCCGGTCACAGAGGTAACCTCGCTCTCTGTGCCCCATT
GCACTTGGTTCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCCATGGAGAATTGGAACCTGACGTGTCTGC
CTGTCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGTCTCTGCATAC
CAGAGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATGGATGATTGG
ATGGGGCTGGAAACAGAAAA

11052894 Banda alta EIAV-2R_08_H10 (PCR Cappelli)

ACTAATTGGCTGAGCCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGCAGAGACCAA
AAAACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAGACACGTCAG
TTCCAATTCTCCATGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCAATGGGGCACAG
AGAGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTTACCTGGGT
CCGAAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGACAGGATTATT
GCGACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATACGCGTCACC
ACCAAACCTTAGCGCCCAACAA

11052894 Banda bassa EIAV-2F_01_A11 (PCR Cappelli)

GTTGAAAGGGCAGCCTGTGATGACTGAACCCCAACAGTGTCTCACCCGAACCTGGCTGATCT
GGCCGCCCTGACCCATTCCCCAGGGGCCAGGCCACTGGGTGGACGGGACTGCCTTTGCCCTGCG
GGTGCTGGGCAGGGAGGTAAGGCTAGAGGTTGGCTGAGTTAAAGCAAGATGCATTGTTGCTT
GGAAGGCCGCTGGCTCCAGGGCTGGGGGACCTCAGAGACCACCAGTGTAAGCCCCTCAGTGGA
CGTGGAGTGAGACTCAGACCAGGGGGAGAAGTGATGGGGCTGGAAACAGAAAA

11052894 Banda bassa EIAV-2R_02_B11 (PCR Cappelli)

GGTCGGAATCTACTCCCGTCCACTGAGGGGCTTACACTGGTGGTCTCTGAGGTCCCCAGCCCT
GGAGCCAGCGGCCTTCCAAGCAACAATGCATCTTGCTTTAACTCAGCCAACCTCTAGCCTTAC
CTCCCTGCCAGCACCCGCAGGGCAAAGGCAGTCCCGTCCACCCAGTGGCCTGGCCCTGGGG
AATGGGTCAGGGCGGCCAGATCAGCCAGGTCGGGGTGAGGACACTGTTGGGGTTTCAGTCATC
ACAGGCTGCCCTCTCCATCTCACAGACCCACCAAACCTTAGCGCCCAAAA

12007321-1 Banda alta EIAV-2F_03_C11 (PCR Cappelli)

TTGGGGAAGAACTAAAGACAGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTCGCAATAATCCTG
TCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGCTCCTTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCGGACCCAGGTGAAA

TGTTTCGCACCTTCCTCACCCATTTGTCCGGTCACAGAGGTAACCTCGCTCTCTGTGCCCCATTGC
ACTTGGTTCCCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCCATGGAGAATTGGAAGTACGCTGTCTGCCTG
TCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGTCTCTGCATAACCAG
AGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATGGATGATTGGATGG
GGCTGGAAACAGAAAA

12007321-1 Banda alta EIAV-2R_04_D11 (PCR Cappelli)

TTAATTTGGCTTGAGCCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGCAGAGACCA
AAAAACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAGACACGTCA
GTTCCAATTCTCCATGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCATGGGGCACA
GAGAGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTTACCTGGG
TCCGGAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGACAGGATTAT
TGCGACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATACGCGTCAC
CACCAAACCTTAGCGCCCCACAAAAA

12007321-1 Banda bassa EIAV-2F_05_E11 (PCR Cappelli)

TGGGAGAAGGCAGCCCTGTGATGACTGAAACCCCAACAGTGTCTCACCCCGACCTGGCTGAT
CTGGCCGCCCTGACCCATTTCCCAGGGGCCAGGCCACTGGGTGGACGGGACTGCCTTTGCCCTG
CGGGTGTGGGCAGGGAAGTAAGGCTAGAGGTTGGCTGAGTTTAAAGCAAGATGCATTGTTGC
TTGGAAGGCCGCTGGCTCCAGGGCTGGGGGACCTCAGAGACCACAGTGTAAAGCCCCTCAGTG
GACGTGGAGTGAGACTCAGACCAGGGGGAGAAGTGATGGGGCTGGAACAGAAA

12007321-1 Banda bassa EIAV-2R_06_F11 (PCR Cappelli)

GGTTGGGATCTACTCCACGTCCACTGAGGGGCTTACACTGGTGGTCTCTGAGGTCCCCAGCCC
TGGAGCCAGCGGCCTTCCAAGCAACAATGCATCTTGCTTTAAACTCAGCCAACCTCTAGCCTTA
CTTCCCTGCCAGCACCCGCAGGGCAAAGGCAGTCCCGTCCACCCAGTGGCCTGGCCCCTGGGG
AATGGGTGAGGGCGGCCAGATCAGCCAGGTGCGGGGTGAGGACACTGTTGGGGTTTCAGTCATC
ACAGGCTGCCCTCTCCATCTCACAGACCACCAAACCTTAGCGCCCCACAAA

11041695 EIAV 2F_07_G03 (PCR Cappelli)

CAAGGGGAAAGAACTAAAAGACAGGGAATGGGGAGAGCAGTGAGGGGGCTGTTCGCAATAAT
CCTGTCCCTCTGCTCGAGATGCTGAGTCCCTTATCTGTCAAACCTCATCCTTTCCGGACCCAGGT
GAAATGTTTCGCACCTTCCTCACCCATTTGTCCGGTCACAGAGGTAACCTCGCTCTCTGTGCCCCA
TTGCACTTGGTTCTACTTCTCGTATTGCACCTAGGCCCATGGAGAATTGGAAGTACGCTGTCTG
CCTGTCTCCTGCACTGCACTATGGGCTCCTCAAGGACAGGGACTGTGTTTTTTGGTCTCTGCATA
CCAGAGCCTAGCACTGTGCCTGGTACAGAATTGGGGCTCAGCAATTAGTTGGATGGATGATTGG
ATGGGGCTGGAACAGAAAA

11041695 EIAV 2R_08_H03 (PCR Cappelli)

CATATTTTGGCTGGAACCCCAATTCTGTACCAGGCACAGTGCTAGGCTCTGGTATGCAGAGACC
AAAAAACACAGTCCCTGTCCTTGAGGAGCCCATAGTGCAGTGCAGGAGACAGGCAGACACGTC
AGTTCCAATTCTCCATGGGCCTAGGTGCAATACGAGAAGTAGGAACCAAGTGCATGGGGCAC
AGAGAGCGAGGTTACCTCTGTGACCGGACAAATGGGTGAGGAAGGTGCGAACATTTACCTGG
GTCCGGAAGGATGAGTTTGACAGATAAAGGAGCTCAGCATCTCGAGCAGAGGGACAGGATTA
TTGCGACAGCCCCCTCACTGCTCTCCCCATTCTGTCTTTAGTTTTCTTCCCCTTAATACGCGTCA
CCACCAAACCTTAGCGCCCCACAAAAA