



**Anemia Infettiva Equina:
attualità e prospettive di controllo a sei anni dalla sorveglianza pianificata
Roma 1° Ottobre 2012**

***DINAMICA DELL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'ANEMIA
INFETTIVA EQUINA IN MULI NATURALMENTE INFETTI.***

**Studio condotto nell'ambito del progetto di ricerca corrente IZSLT 8/7, approvato e finanziato dal
Ministero della Salute**



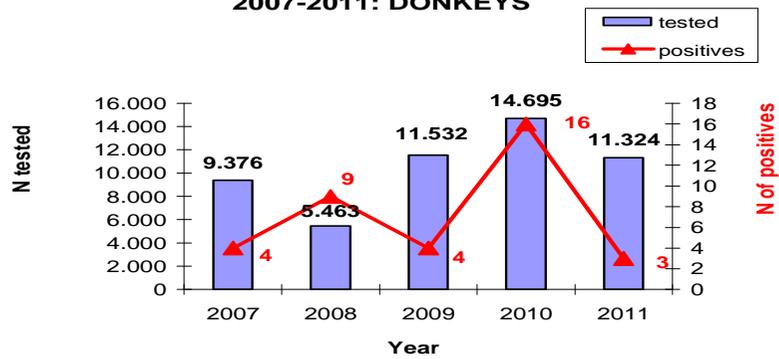
Distribuzione dei casi di AIE tra le specie esaminate durante l'attività di sorveglianza nel periodo 2007-2011

<http://www.izslt.it/izslt/>

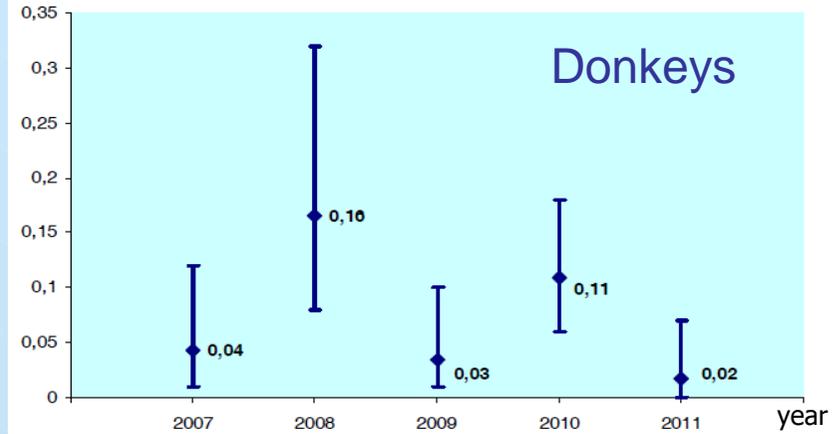
2007-2011 report dell'attività di sorveglianza per AIE svolta dal CRAIE.



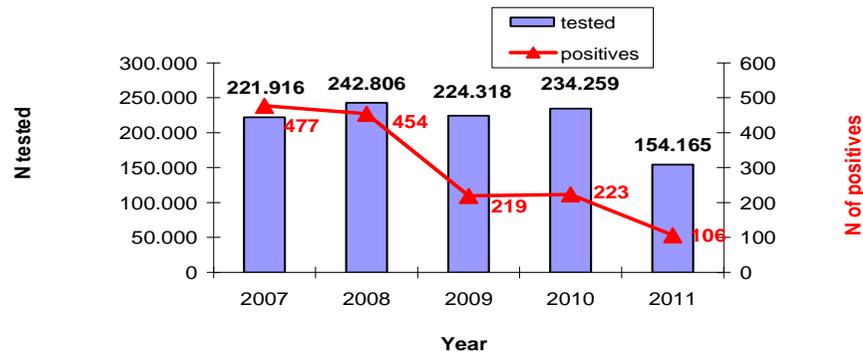
2007-2011: DONKEYS



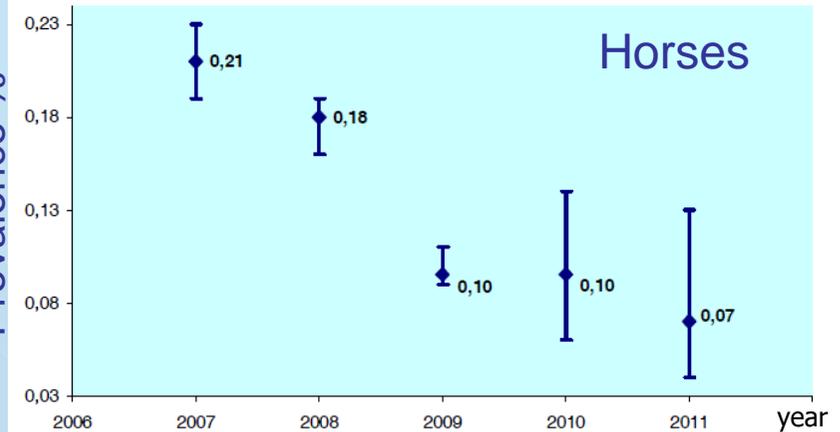
Prevalence %



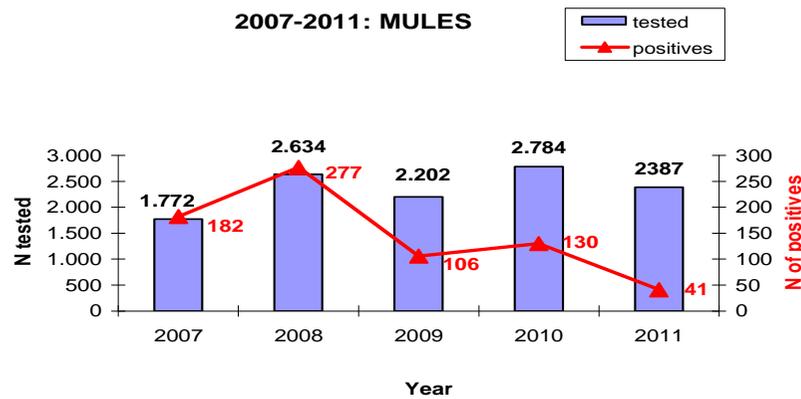
HORSES



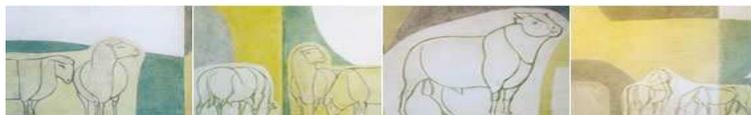
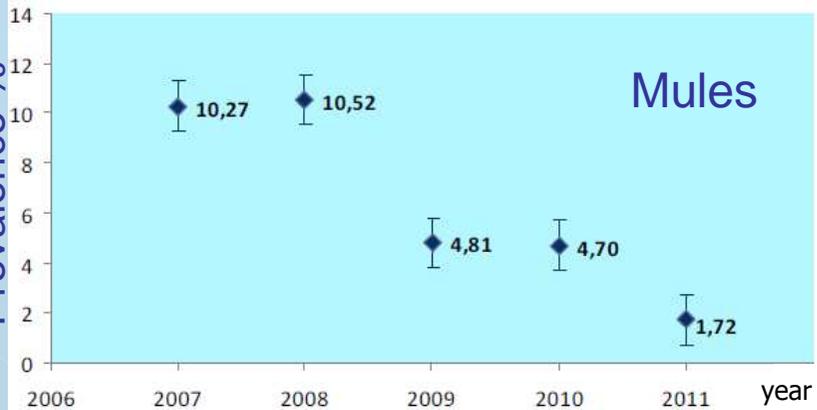
Prevalence %



2007-2011: MULES



Prevalence %



Come interpretare lo stato di infezione di animali apparentemente negativi in AGID

– valore predittivo positivo di reazioni Elisa/IB positive?

	Number	Rate
Samples tested in survey	96,468	
Positive in IT C-ELISA	331	0.34%
Positive IT C-ELISA and AGIDT	124	0.13%
Positive IT C-ELISA and Negative AGIDT	207	
Negative Immunoblot	182	88%
Positive Immunoblot	25	12%
Overall number judged positive for EIA	124+25 = 149	0.15%
Total Number of samples tested in survey	96,468	
Apparent False-Positive IT C-ELISA	182	0.19%
Apparent False-Negative AGIDT	25	0.026%

13/25 apparenti falsi negativi in AGID sono muli di cui 11/13 provenivano da focolai prevalenti.



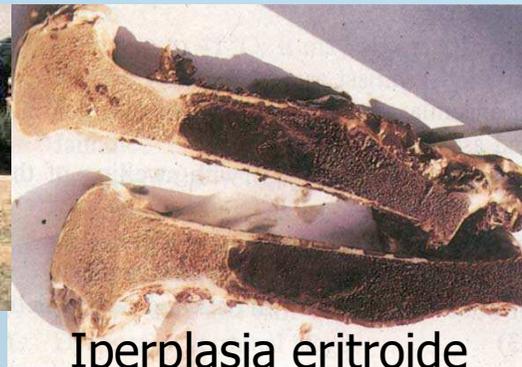
Segni clinici della malattia descritti maggiormente nella specie equina

<http://www.fao.org/docrep/003/t0756e/T0756E07.htm>

Decorso per lo più subclinico/inapparente ma può essere anche acuto/cronico in cavalli infetti con lo stesso agente virale. (*Hammond et. al. 2000, Leroux et. al. 2001, Cook et. al. 2001*).



Fegato rosso/grigiastro aumentato di volume con pattern lobolare ed emorragie sottocapsulare.



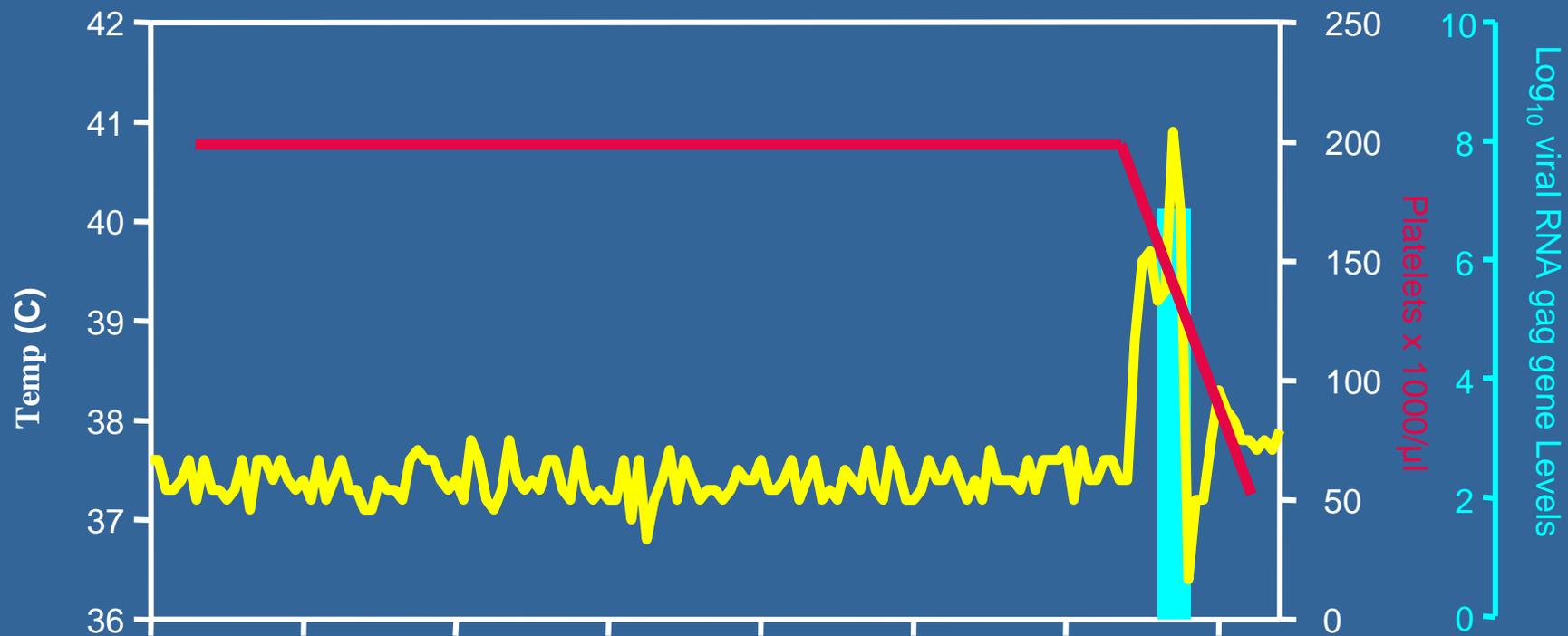
Iperplasia eritroide

Casi cronici caratterizzati da cicli intermittenti di: febbre, anemia, dimagrimento e letargia alternata a periodi di normalità.

La riacuteizzazione può seguire a fatti quali: stress, malnutrizione, lavoro eccessivo o interventi chirurgici.



Principali parametri di valutazione in corso di infezione da virus AIE



Scarse le informazioni in letteratura sull' AIE nei muli



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

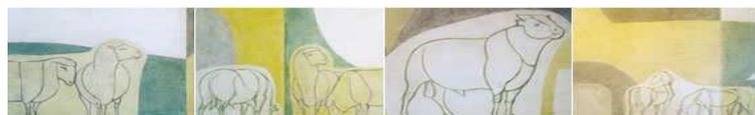
Veterinary Microbiology 95 (2003) 49–59

**veterinary
microbiology**

www.elsevier.com/locate/vetmic

Equine infectious anemia in mules: virus isolation and pathogenicity studies

V. Spyrou^a, M. Papanastassopoulou^a, V. Psychas^b,
Ch. Billinis^a, M. Koumbati^a, J. Vlemmas^b,
G. Koptopoulos^{a,*}



Obiettivo dello Studio

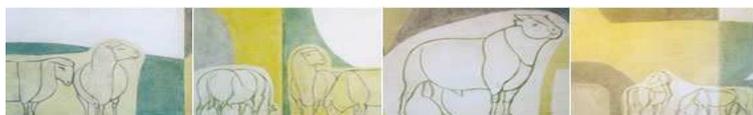
Determinare lo **stato virologico** e il **significato epidemiologico** di muli con risultato sierologico equivoco per AIE.

Experimental Identification N°	Province of Origin	Age	Sex
1	Rieti	12	F
2	Latina	2	F
3	Aquila	30	F
4	Roma	22	F
5	Roma	9	F
6	Roma	8	F
7	Frosinone	11	CM
8	Aquila	17	F
9	Frosinone	11	F
10	Frosinone	7	F



Studio longitudinale su un gruppo
10 muli naturalmente infetti
provenienti da 5 differenti focolai,
comprendente
**5 soggetti con patterns
sierologico Elisa/AGID
equivoci**

**Dettagli e set-up dello studio
osservazionale**



Dettagli sul gruppo di studio e sul set-up dello studio osservazionale

Anamnesi clinica riferiva che alcuni soggetti presentavano riduzioni di performance e debolezza senza altri apparenti segni clinici;

Acquisti effettuati dopo che i proprietari avevano optato per la macellazione;

La struttura dell'IZS presso cui è stato condotto lo studio è stata autorizzata dal Servizio Veterinario e dalla Regione; la stessa è stata dichiarata focolaio di AIE e adottando tutte le misure di biosicurezza volte ad escludere la possibile diffusione.



La conferma di positività per AIE effettuata su campioni dei soggetti prelevati, prima dell'arruolamento, mediante;

- PCR; tutti i muli risultavano PCR positivi e il sequenziamento degli amplificati mostrava omologia con i ceppi circolanti del virus dell'AIE, *Cappelli et al, 2011.*
- Tutti i muli risultavano Immunoblotting (IB) positivi *Issel et. al, 1999.*



Disegno sperimentale

Durata dello studio : Circa 4 mesi.

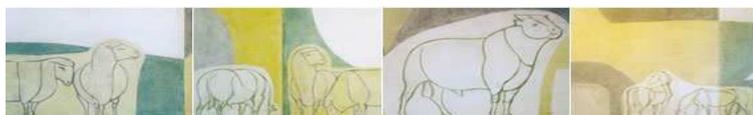
Esame clinico

Monitoraggio quotidiano – esame obiettivo generale

Raccolta dei campioni

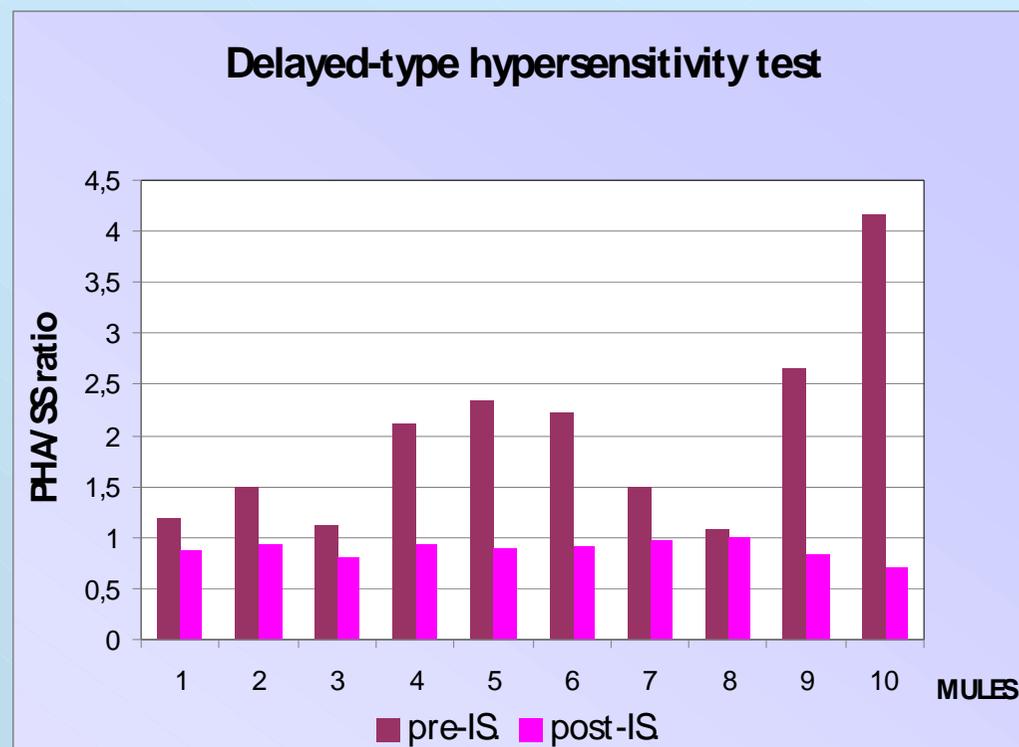
Sangue con e senza anticoagulante prelevato giornalmente.

Immunosoppressione (IS) & verifica – somministrazione di desametazone a metà del periodo di osservazione (*Craigo et. al, 2007* - dosi nei limiti dei livelli terapeutici)



Verifica dell' IS

Lo stato immunitario è stato valutato pre e post IS mediante un **saggio di ipersensibilità ritardata (DTH)** indotta da PHA.



Per la valutazione del DTH è stato stimato il rapporto tra lo spessore delle pliche cutanee corrispondenti ai punti di inoculo dell'antigene (PHA) e della soluzione salina usata come controllo negativo.



Parametri di laboratorio valutati e metodi diagnostici impiegati

Conta piastrinica ($\log_{10}/\mu\text{L}$) (contatore automatico Cell-Dyn 3700 ABBOTT)

Diagnostica sierologica qualitativa e quantitativa utilizzando il sistema su tre livelli (three tier system):

ELISA competitiva in house (C-ELISA) (*Amaddeo - 1998*)



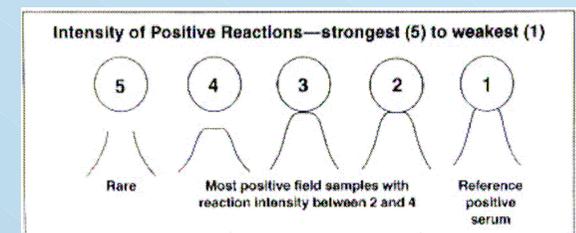
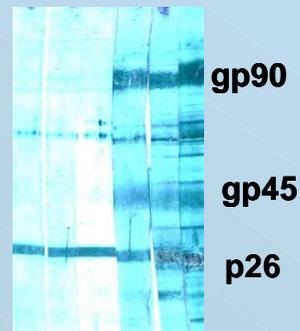
Valutazione quantitativa della risposta sierologica

Test AGID con metodo Coggins (*Coggins et. al, 1972*) ed

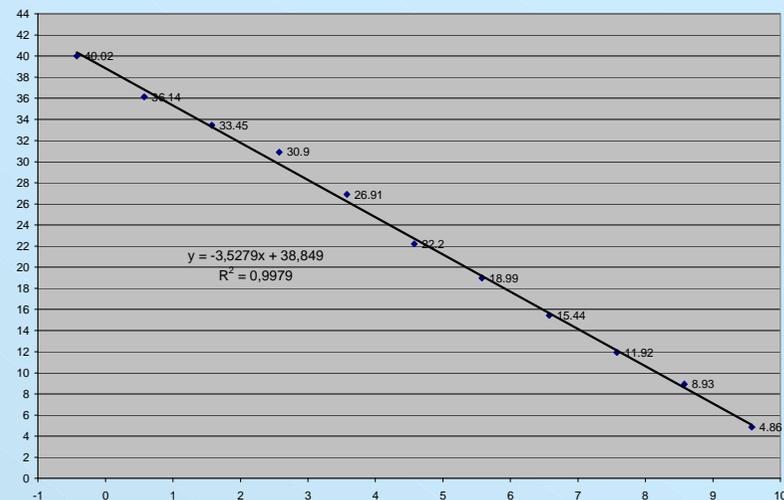
OIE (OIE Diagnostic Terrestrial Manual, 2008)



IB – (*Issel et. al, 1999*) –
campione positivo se mostra
una banda in corrispondenza
della p26 e ad almeno 1 delle
altre 2 glicoproteine



Per la determinazione del numero di copie di RNA virale plasma-associato è stata impiegata una TaqMan® based RT-PCR, diretta contro l'esone 1 del gene *tat*, utilizzando uno standard interno quantificato



Primer disegnati - da Dott. F. Cook

MkIII Forward : 5'-GGC GCC CGA ACA GGG ACC-3' (UK position numbers = 310-327)

MkIII Reverse 1: 5'-TGG CCA GGA ACA CCT CCA GAA GAC-3' (UK position numbers = 405-428)

Probe LNA EIAV : 5'-FAM -T+GA ACC T+GG +CTG ATC G+TA G+GA-3'BHQ 1

Profilo della reazione

1° fase – estrazione del RNA - **140 µl di plasma**, utilizzando un estrattore automatico Qiacube® con Mini kit Viral RNA della Qiagen

2° fase – sintesi del cDNA - High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems®)

Thermal profile - 25°C for 10', 37°C for 120', 85°C for 5' & 4°C ∞

3° fase - Real Time qPCR - TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®)

Profilo termico - 50°C per 2', 95°C per 10', 50 cicli: 95°C per 15", 52°C per 30" e 60°C per 1', 72°C per 2'



RISULTATI

Reactivity of serum samples in AGIDT

Days Post-IS	Mules									
	10	2	4	9	1	5	8	7	3	6
-7	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0
0	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0
7	2	3	3	2	2	1	1	1	0	0
14	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0
21	4	3	3	4	2	1	1	1	0	0
28	4	3	3	4	2	2	1	1	0	0

Alta Reattività

Bassa Reattività

Reciprocal of end-point Elisa titres

Mules

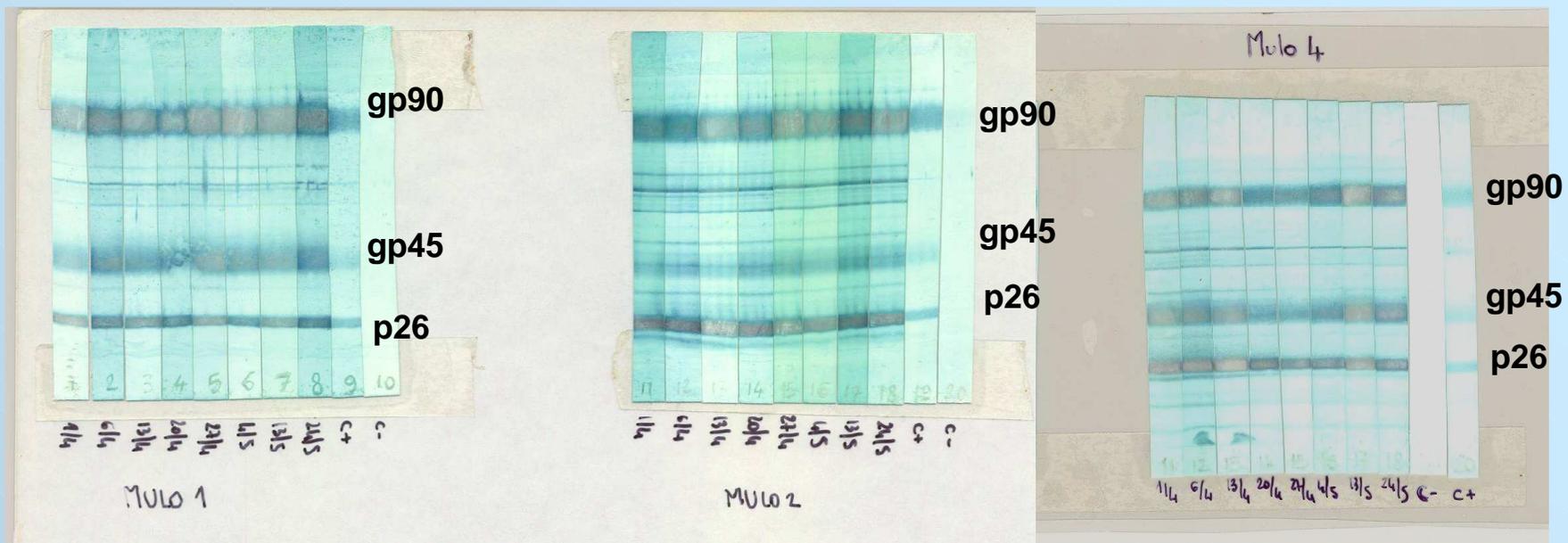
Days Post-IS	4	10	9	2	1	5	8	7	3	6
-7	576	192	24	192	48	12	48	6	0	0
0	576	192	48	192	192	12	24	6	6	0
7	576	192	48	192	48	12	12	0	6	0
14	384	192	0	192	48	12	12	6	0	0
21	192	576	576	192	48	12	48	12	12	0
28	192	576	576	192	48	192	48	48	12	+/-

Alta reattività

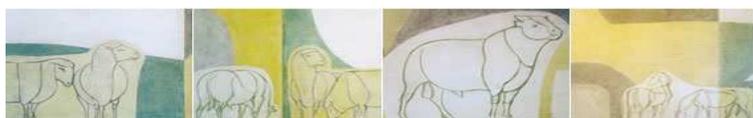
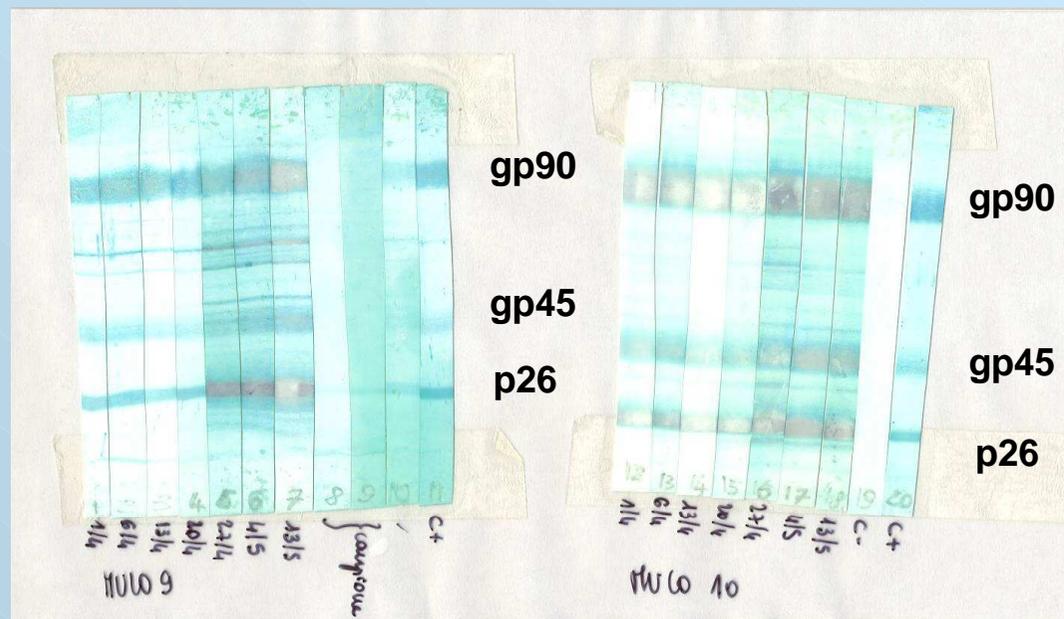
Bassa Reattività

Esiti sierologici dell'AGID e dell'ELISA





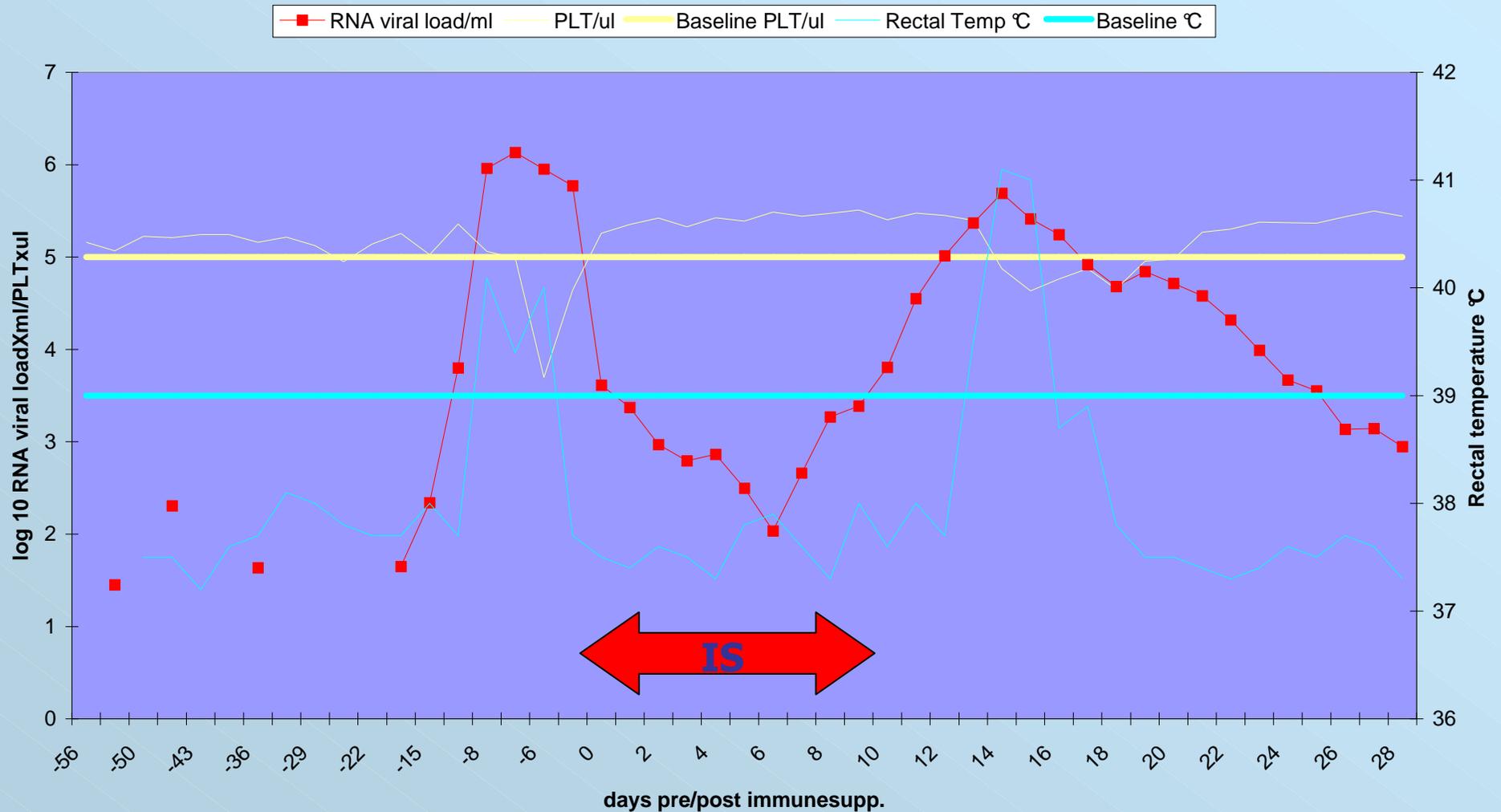
Risultati dell'IB dei muli con reattività evidente ai test AGID/Elisa

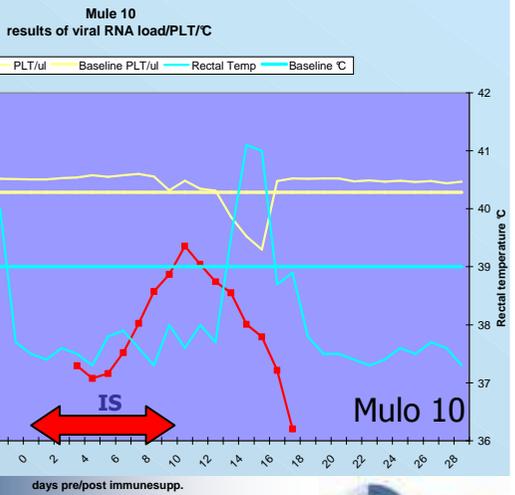
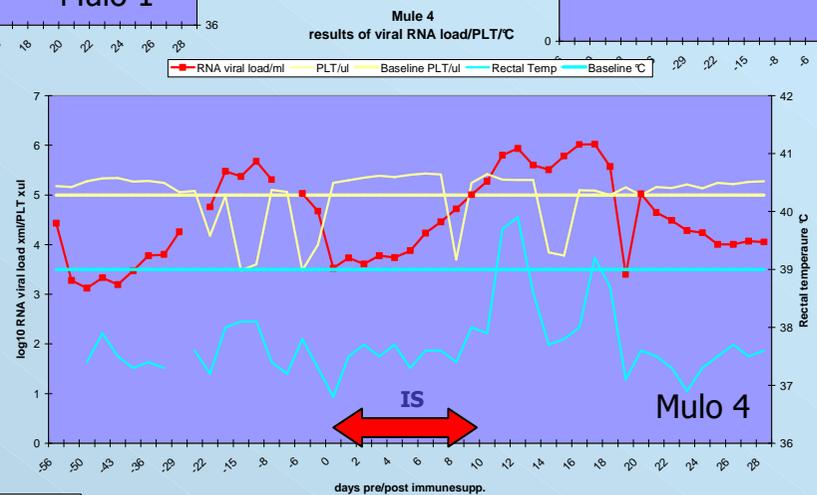
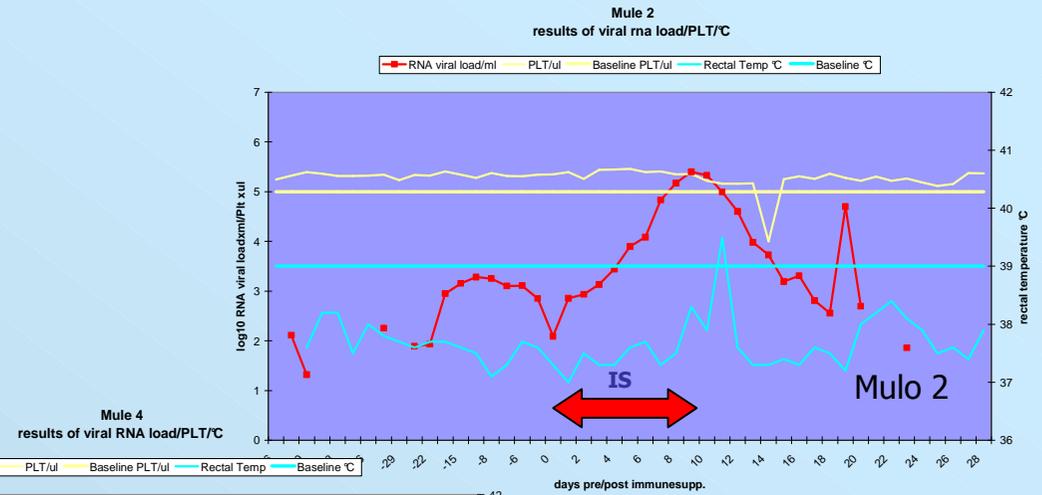
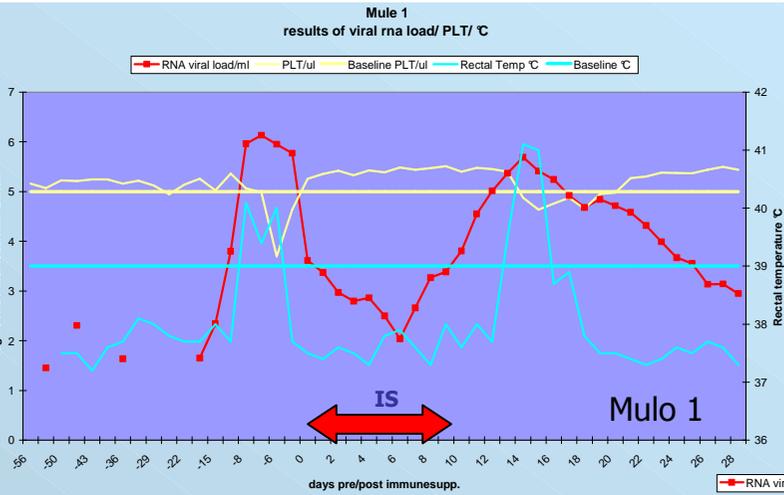


Esempio dell'evoluzione temporale del RNA virale plasma-associato, conta piastrinica (plt) e febbre (°C)

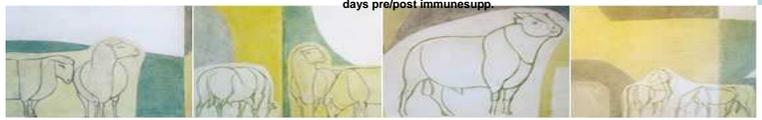
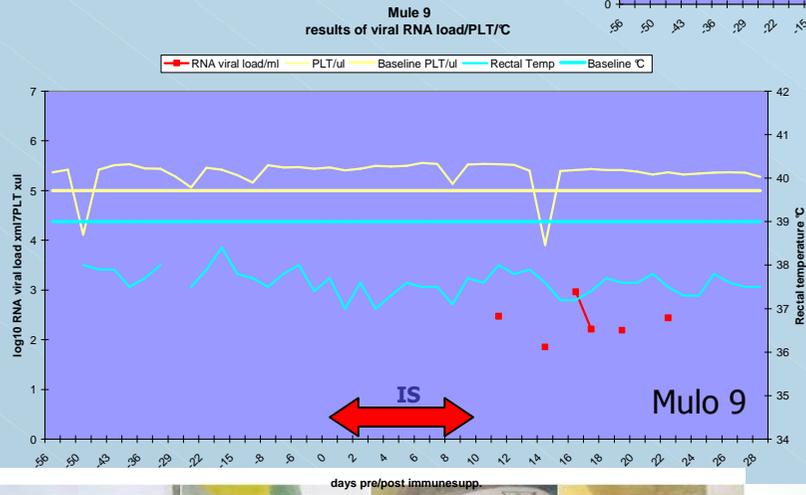
Mule 1

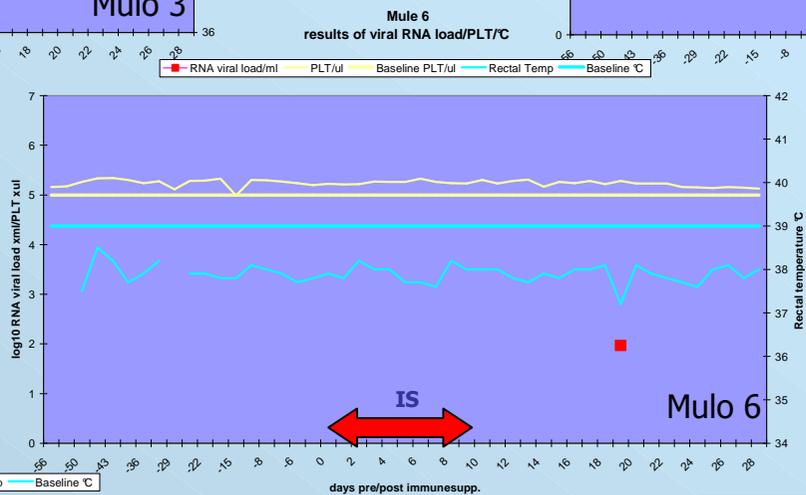
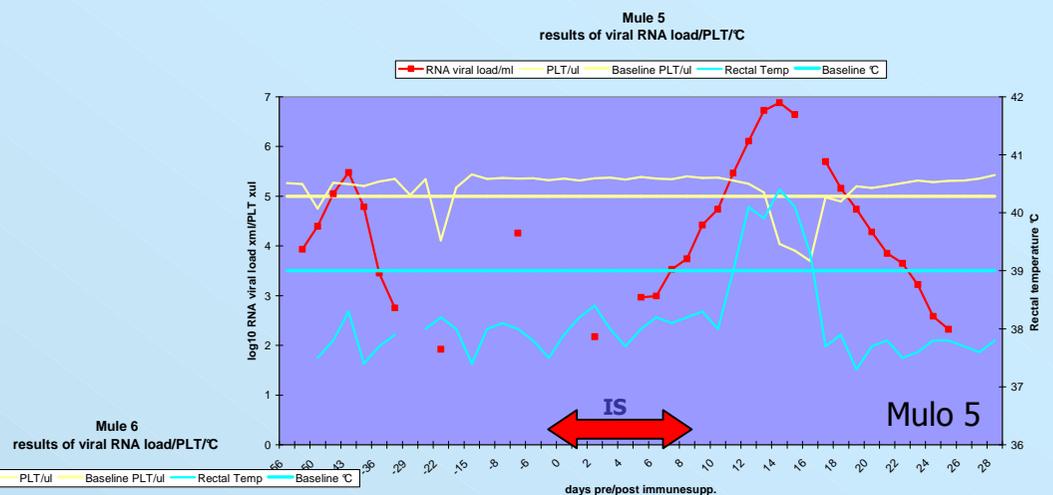
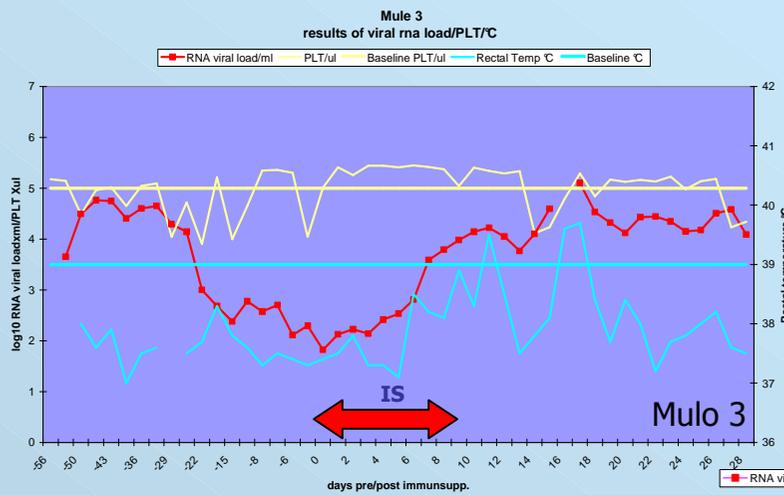
results of viral rna load/ PLT/ °C



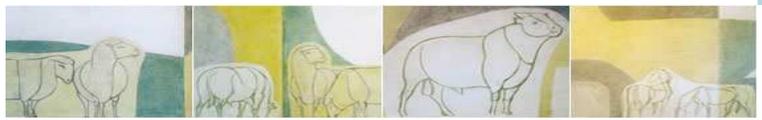
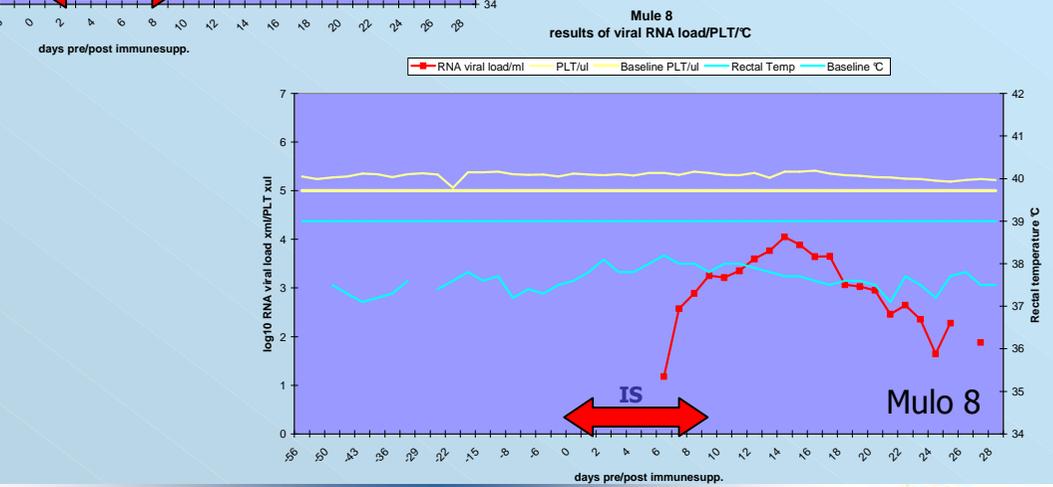
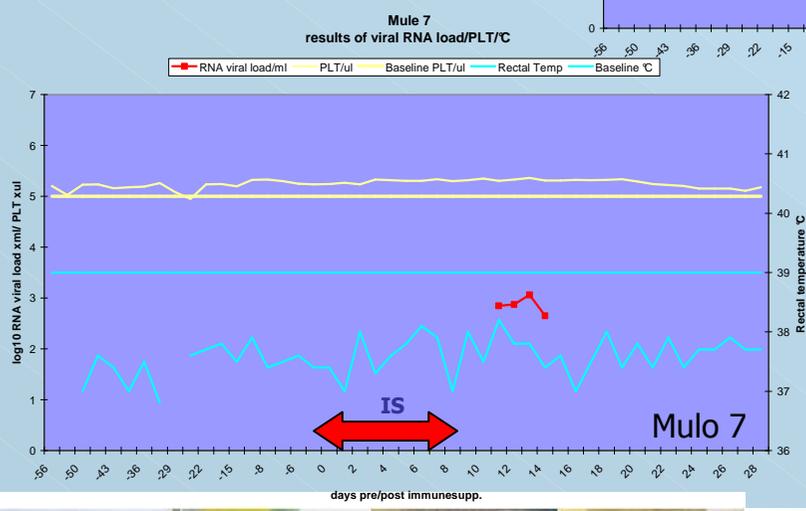


Profili del RNA virale/plt/°C dei muli con reattività evidente ai test AGID/Elisa





Profili del RNA virale/plt/°C dei muli con bassa reattività ai test AGID/Elisa



Segni Clinici

D.P.IS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9		H								
10										P
11		A, D								P
12		A								
13			A	D	A					A
14		A	A	D						A
15	D		A		J,P, D		D		D	
16			A,D	A	J			A		
17	D		D	D						
18	H	A	J	A		A			A	A
19		A		A,J	A	A,J				
20	D	A	A,J	E,A	A	A		A	A	
21		A	A	E	A					
22		A			A					
23			D							
24		A			A				J	
25			D	A,D						
26			D							
27		A			A					

I segni clinici erano quasi inapparente, probabilmente perché succedevano in corso di ricaduta dell'infezione



fever

thrombocytopenia

fever & thrombocytopenia

A anemia

D depression

P polypneia

H

J

E

hyperemia

jaundice

oedema



Altri risultati

- **sequenze nucleotidiche dei prodotti di PCR hanno confermato tutti i muli come infetti con il virus dell'AIE** - stipiti virali simili a quelli identificati in passato come ceppi europei (6 stipiti con elevata omologia al ceppo EIAVRom-4 (GU060662.1), 2 al ceppo EIAVIta-1 (EU240733.1) e 2 al ceppo EIAVIta-90 (HQ888862.1)) - **(differenti quadri clinici con lo stesso ceppo)**
- Prima dell' IS, **l'RNA virale è stato rilevato in almeno un campione di 7 muli**, tra questi un animale con reazione AGID negativa (dovuta ad altre condizioni di stress ???)
- In alcuni soggetti, di cui 3 con bassa reattività all' AGID, abbiamo nel tempo, osservato una notevole variabilità dell'RNA virale plasma-associata, con incrementi da **95 a 30.000 volte**, e differenze individuali significative in termini di durata (**impossibile definire la durata avendo sospeso l'osservazione al quarto mese**)



Altri risultati – cont'd

- Dopo l'IS, per tutti i muli abbiamo rilevato **un incremento dell'RNA plasma-associato**, con valori che raggiungevano **$\log_{10}6$ copie di RNA/ml per 4 muli.**
- **Solo 3 hanno avuto un incremento di 4 volte dei titoli anticorpale in C-ELISA e 2 muli sono rimasti AGID negativi** (1 dei quali anche C-ELISA negativo).
- **Non è stata rilevata nessuna correlazione tra: trend virologico e risultati sierologici negativi in AGID, caratteristiche individuali & ceppi virali.**
- **Concentrazioni di genoma virale simili a quelle osservate in casi acuti di AIE in cavalli nell'episodio Irlandese** (*Quinlivan M., et. al. 2007*).



Altri risultati – cont'd

- **Segni clinici non specifici, transitori e non gravi** in tutti i muli → gli animali AGID negativi **non sarebbero stati rilevati in caso di sorveglianza sindromica**
- Animali con **reattività sierologica equivoca non possono** essere considerati a **rischio zero** di trasmissione dell'infezione



Solo considerazioni!

L' utilizzo esclusivo del test di AGID può classificare animali come falsi negativi e aumentare il rischio di diffusione dell'infezione

La sola AGID o un sistema su 2 livelli (Elisa e AGID) non è efficiente

Alto valore predittivo positivo di una risposta Elisa-IB positivi/Agid negativo

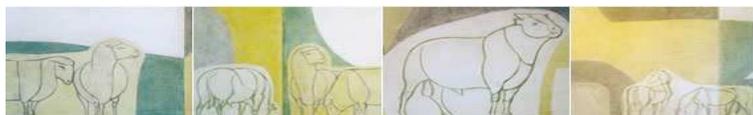
Analoghe misure di biosicurezza ai soggetti positivi per gli animali con risposta sierologica equivoca ...

Quale il costo (diretto e indiretto) di questi animali nel contesto di in un programma nazionale di sorveglianza?



Collaborazioni e Ringraziamenti

- Studio effettuato in collaborazione con il Gluck Equine Research Centre (Lexington, USA)
- Servizi Veterinari dell'ASL Roma G, dell'Aquila e di Latina per il supporto pratico
- Direzioni operative VIR, OEVR, DIAG, RIA, DMV e le sezioni di Rieti e Latina per il supporto tecnico





**EQUINE INFECTIOUS ANAEMIA:
LESSONS LEARNED FROM THE SIX-YEAR
APPLICATION OF
THE NATIONAL ITALIAN SURVEILLANCE
Rome 1st October 2012**

Vi ringrazio
per
l'attenzione

Thank you
for your
attention

