

**SINTESI : Progetto IZS LT 16/11 RC: Stima delle prevalenze delle infezioni da Babesia caballi e Theileria equi ed Anaplasma phagocytophilum nelle regioni Lazio e Toscana. Messa a punto di metodi quantitativi ed analisi di differenti metodi diagnostici in uso in relazione allo stato sanitario dei soggetti infetti.**

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

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

Studio di prevalenza sulla popolazione equina del Centro-Sud Italia. Il numero minimo di campioni da analizzare è risultato 384. Sono stati prelevati campioni di sangue, con e senza EDTA. Per identificare i fattori di rischio correlati alle piroplasmosi equine, i dati sulle seguenti variabili sono state registrati: sesso (castrone, maschio femmina); età (giovani  $\leq 6$  anni; adulti tra 7 e 12 anni; anziani  $> 12$  anni); razza (razza straniera; razza italiana: razza mista); accesso al pascolo (sì /no); posizione provincia di residenza (costiera / entroterra); altitudine ( $\leq 150$  metri sul livello del mare (m s.l.m.); 151-600 m s.l.m.;  $> 600$  m s.l.m.); copertura del suolo ( $> 75\%$  di foresta; colture 50-75%; 50-75% foresta; misti, senza dominante della copertura del suolo); zona climatica, tipo di suolo, secondo la classificazione FAO. Due kit ELISA competitive (cELISA) *B. equi* Antibody test kit and *B. caballi* Antibody test kit (VMRD R, Inc, Pullman, WA, USA) sono stati impiegati. I campioni sono stati esaminati con la due Real Time PCR (Kim et al. 2008 per *T. equi* e Bhoora et al. 2010, per *B. caballi*). La specificità dei risultati delle rtPCR è stato verificato mediante sequenziamento degli ampliconi di un numero di campioni positivi (44), ottenuti utilizzando un protocollo di nested-PCR (Nagore et al. 2004) per la regione ipervariabile V4 del gene 18S. Le sequenze ottenute sono

state analizzate e confrontate con quelle depositate su NCBI GenBank. Sono state calcolate la prevalenza sierologica e la percentuale di PCR-positivi tra i sieropositivi con un IC 95% a livello dell'area di studio, della provincia di residenza e per ogni fattore di rischio indagato. L'associazione tra variabili e positività è stata verificata con un'analisi univariata e multivariata. La situazione epidemiologica è riportata in Figura 1. Questo studio definisce la presenza di una elevata sieroprevalenza e di un elevato numero di malattia asintomatica in cavalli PCR-positivi per entrambi i parassiti, con un cluster nella regione Lazio. Diversi fattori di rischio associati con l'ospite e l'ambiente sono risultati significativamente correlati alla positività per Piroplasmosi Equine. Ulteriori indagini sull'influenza dei fattori ambientali sono necessarie e in particolare sull'ecologia e la distribuzione di zecche in quest'area. Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, programmi di controllo potrebbero essere sviluppati con l'adozione di pratiche idonee, tra cui controllo delle zecche, utilizzo del territorio ed adeguatezza della gestione del cavallo, utili nel limitare gli interventi farmacologici.

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

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

I protocolli di PCR analizzati sono i seguenti: *T. equi* (T): End Point PCR (T1) (Battsetseg B. et al.; 2001); Nested-PCR (T2), (Nicolaiewsky T.B. et al.; 2001); Real Time PCR (T3) (Kim C. et al.; 2008); Real Time *T. Equi* Genesig R (T4). Per B. cavalli End Point PCR (B1) (Battsetseg B. et al.; 4 di 75

2001), Nested PCR (B2), (Bhoora et al.; 2010); Real Time PCR (B3) (Bhoora et al.; 2010); Real Time B. cavalli (Genesig R) (B4). La specificità dei risultati discordanti è stata verificata mediante sequenziamento. La PCR che ha rilevato il maggior numero di positivi è stata utilizzata per il calcolo della sensibilità (RSE) e specificità relativa (RSP). Successivamente un campione di 1300 soggetti pervenuti presso il laboratorio CERME per diagnostica o ricerca sono stati retrospettivamente raccolti e i risultati delle analisi effettuate sono stati confrontati. I metodi diagnostici utilizzati sono i seguenti: esame microscopico di striscio di sangue; Real Time PCR per *T. equi* e B. cavalli (Kim C. et al.; 2008; Bhoora et al.; 2010 e Genesig R); cELISA B. cavalli e B. equi Antibody test kit (VMRDR, Inc, Pullman, WA, USA); B. cavalli e B. equi IFA IgG Antibody Kit

(Fuller LaboratoriesR). Per l'analisi filogenetica sono stati selezionati 100 campioni di sangue da equidi del Centro-Sud Italia. L'omologia di sequenza è stata effettuata utilizzando BLAST e NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sono stati costruiti alberi filogenetici utilizzando

Geneious 9.1.3. È stato utilizzato il modello di distanza genetica Tamura-Nei e il metodo neighborjoining

senza outgroup. La relazione tra presenza di sintomatologia, discordanza tra test sierologico e PCR variabili e i gruppi filogenetici sono state valutate usando il test esatto di Fisher o la Chi quadro.

### **WP 3 “Studio caso/controllo per l’ identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione**

#### **dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi”**

Durante le stagioni vettoriali 2013 e 2014 campioni di soggetti sospetti e di soggetti asintomatici sono stati prelevati in tutto il territorio di competenza dell’ Istituto Zooprofilattico. I campioni consistevano in sangue con e senza anticoagulante ed ogni prelievo doveva essere accompagnato da una scheda anamnestica. Sui campioni sono state eseguite le seguenti analisi:

Anaplasma (IFI e PCR); Babesia (ELISA, IFI e PCR); Theileria (ELISA, IFI e PCR); Leptospira (MAT e PCR); Anemia Infettiva Equina (ELISA); Striscio ematico periferico (esame microscopico); emocromo e protidogramma e ,diversi parametri biochimici. Sulla base dei risultati ogni sospetto e controllo è stato classificato come confermato o meno e i casi ulteriormente suddivisi in base al parassita riscontrato. È stata effettuata un’ analisi descrittiva e associazioni tra fattori di rischio. Inoltre è stata effettuata un’ analisi descrittiva e associazioni tra parametri ematobiochimici vs caso/controllo. Per ogni sintomo è stata eseguita un’ analisi descrittiva stratificata per tipo di caso confermato per numero di sintomi. Per tutte le analisi statistiche è stato considerato come significativo un  $p < 0,05$ . I risultati sono riportati nel Grafico 1.

Quando impiegato in Italia, il cELISA per B. caballi sembra essere inefficace, come la PCR commerciale per entrambi i parassiti. L’ IFAT sia per piroplasmi e cELISA per T. equi sembra essere

utile, come la PCR letteratura per entrambi i parassiti, per valutare lo stato sanitario di un soggetto e indirizzare il libero professionista. Alla situazione attuale, l’ algoritmo diagnostico proposto in Tabella 1 sembra garantire le migliori prestazioni sensibilità ed efficacia nella diagnosi EP. Per quanto riguarda lo studio filogenetico anche in Italia sembrano essere presenti tre tipologie genetiche di piroplasmi Gruppo 1, 2 e 3. Il gruppo 1 sembra includere ceppi parassitari più patogeni, che causano però una risposta anticorpale assente, ridotta o non rilevata dai test in uso; mentre sono rilevati dalla PCR. Al contrario i ceppi degli altri due gruppi, sembrano essere correlati con uno stato asintomatico, rilevabile sierologicamente ma non con la PCR. Studi più approfonditi sono necessari per chiarire questi risultati.

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

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