



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

WOAH Reference Laboratory
for Equine Infectious Anaemia

Reference
Laboratory



World Organisation
for Animal Health



Ministero della Salute

CONVEGNO INTERNAZIONALE
“IL RUOLO DEI CENTRI DI REFERENZA PER LE MALATTIE
DEGLI EQUINI NELLA GESTIONE SANITARIA DEL CAVALLO”

Studi di prevalenza di alcune malattie virali emergenti degli equini



Centro di Referenza Nazionale
per l'Anemia Infettiva Equina

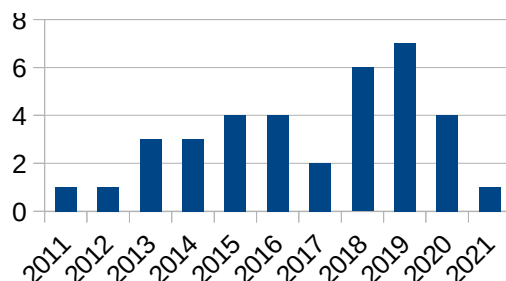


Centro di Referenza Nazionale
per le Malattie degli Equini

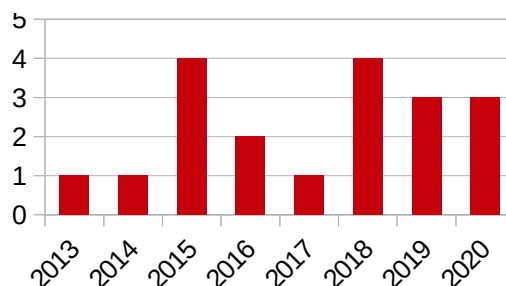
Dott. Ida Ricci, Giulia Pacchiarotti
UOC Virologia - IZSLT - Rome

7 DICEMBRE 2022
Ministero della Salute
Via Giorgio Ribotta, 5 - ROME
Sala Auditorium B. Alba

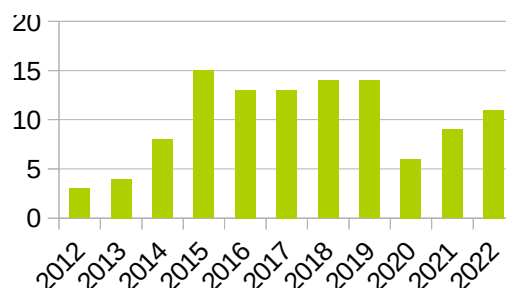




■ Numerosità articoli EqPg



■ Numerosità articoli TDAV



■ Numerosità articoli EqHV

Fonte Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>

Equine Pegivirus { (EqPg) 1 (EqPg) 2 → Theiler's Virus Disease ?

- Equine Hepacivirus (EqHV)
- Equine Coronavirus (EcoV)



RESEARCH ARTICLE

Equine pegiviruses cause persistent infection of bone marrow and are not associated with hepatitis



Fahnoe, Himanshu Sharma, Muchi, Christina Holm, Sant, Jens Bukh, Amit Kapoor, Van de Walle, Troels K. H. Scheel



First report of equine parvovirus-hepatitis and equine hepacivirus coinfection in horses in Korea

Jung-ho Yoon, Taemook Park, Ahram Kim, Heeun Song, Byung-Joo Park, Hee-Seop Ahn, Hyeon-Jeong Go, Dong-Hwi Kim, Joong-Bok Lee, Seung-Yong Park, Chang-Seon Song, Sang-Won Lee, In-Soo Choi

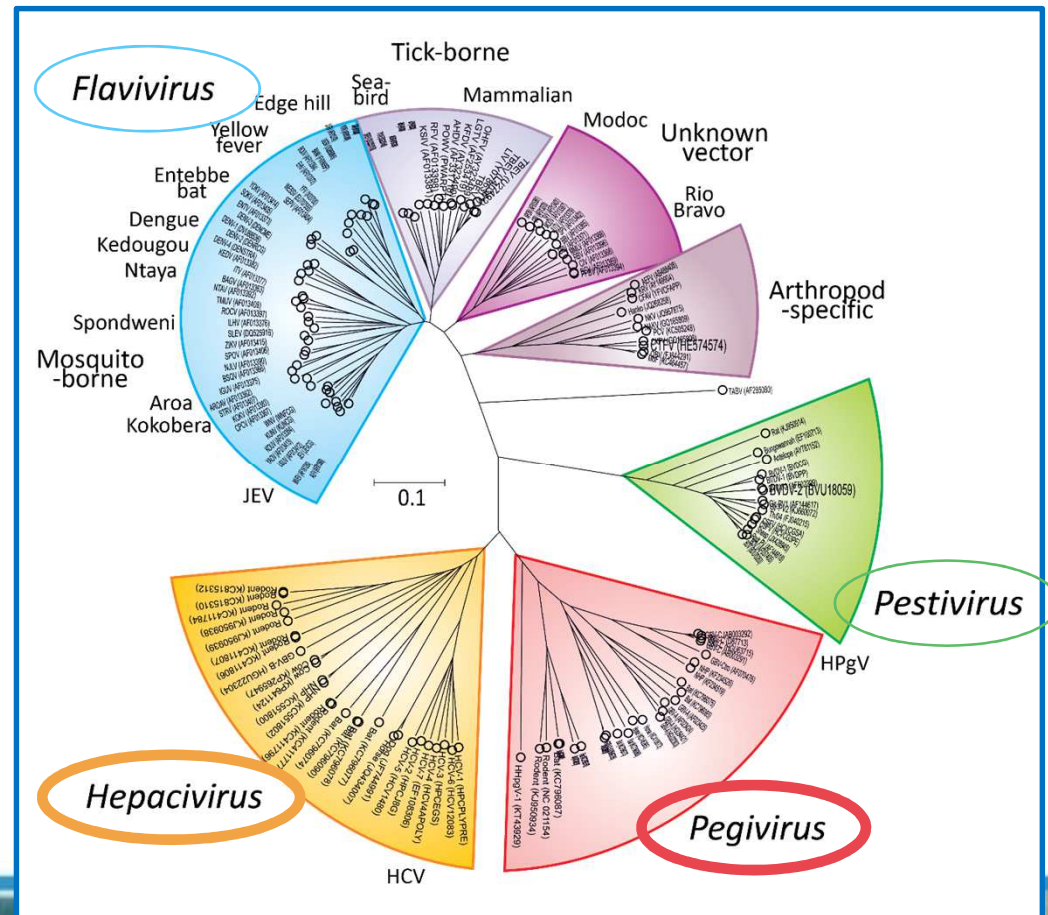
Famiglia *Flaviviridae* (+ssRNA) 4 generi:
Flavivirus, *Pestivirus*, ***Pegivirus*** ed ***Hepacivirus***.

Pegivirus:

- Virus spesso presenti in co-infezione con altri virus;
- infettano un ampio range di ospiti (principalmente mammiferi);
- non ci sono ancora chiare evidenze di patogenicità associata a infezioni specifiche.

Hepacivirus:

- Piccoli virus epatotropici (epatiti acute e croniche in varie specie di ospiti es. uomo, roditori, mammiferi, uccelli);
- Il Virus dell'Epatite C (HCV) è incluso in questo genere.



PEGIVIRUS E HEPACIVIRUS

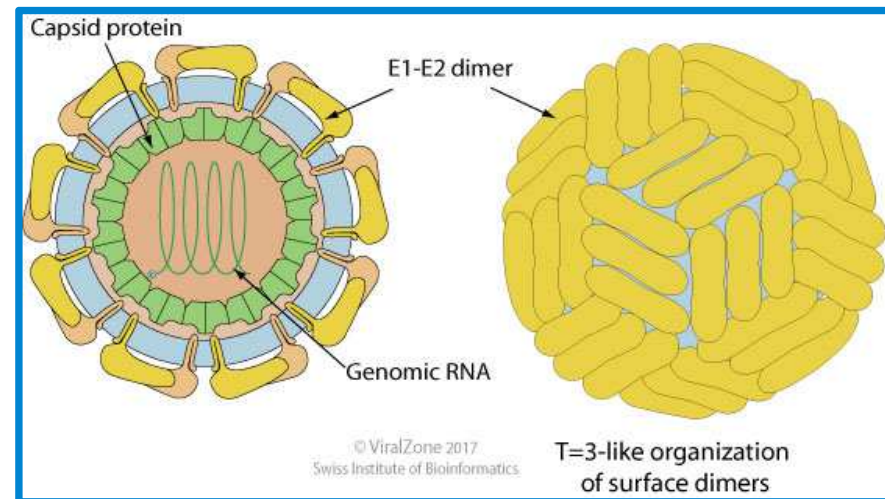
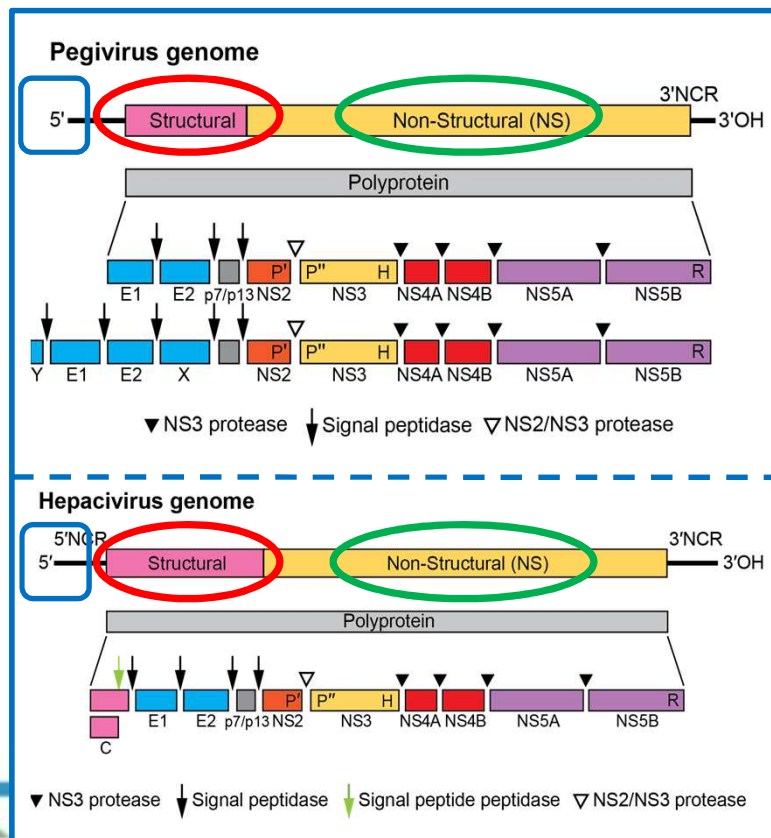
classificazione e morfologia

struttura genetica simile a tutti i membri della famiglia *Flaviviridae*.



Posseggono un solo ORF (Opening Reading Frame) e, in sequenza, proteine strutturali e non strutturali (NS).

Le proteine strutturali (E1/E2) intervengono nell'interazione con la cellula ospite.



sintomatologia

- Vengono attualmente riconosciuti 2 distinti Pegivirus equini:

- EPgV-1 o Pegivirus E
- EPgV-2 o Pegivirus D (prima TDAV)

Causano infezioni persistenti (> 6 mesi); grado di patogenicità ancora sconosciuto (Tomlinson *et al.*, 2020)

Tessuto elettivo: midollo osseo (Tomlinson *et al.*, 2020);

- Come nell'uomo spesso presenti co-infezioni con altri virus (es. hepacivirus)

TDAV (oggi EPgV-2) inizialmente riconosciuto come agente causale di epatiti severe (Chandriani et al., 2013) associate alla forma clinica definita «Theiler's Disease»

Received: 21 February 2019 | Revised: 21 March 2019 | Accepted: 17 April 2019
DOI: 10.1111/tbed.13210

ORIGINAL ARTICLE

First description of Theiler's disease-associated virus infection and epidemiological investigation of equine pegivirus and equine hepacivirus coinfection in Brazil

Andreza Soriano Figueiredo¹ | Maria Vitória dos Santos de Moraes¹ | Caroline Cordeiro Soares² | Flávia Lowen Levy Chalhoub³ | Ana Maria Bispo de Filippis³ | Debora Regina Lopes dos Santos⁴ | Fernando Queiroz de Almeida⁴ | Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi⁵ | Aline Moreira de Souza⁶ | Tatiana Rozental Burdman⁷ | Elba Regina Sampaio de Lemos⁷ | Jenner Karlisson Pimenta dos Reis⁸ | Oswaldo Gonçalves Cruz⁹ | Marcelo Alves Pinto¹

Clinical Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE

IDS
Infectious Diseases Society of America

hivma
HIV Medicine Association

OXFORD

A Novel Human Pegivirus, HPgV-2 (HHpgV-1), Is Tightly Associated With Hepatitis C Virus (HCV) Infection and HCV/Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coinfection

Haiying Wang,^{1,2} Zhengwei Wan,^{1,2} Ru Xu,^{2,3} Yujuan Guan,^{1,2} Nailing Zhu,^{1,2} Jianping Li,² Zhiwei Xie,² Aiqi Lu,² Fuchun Zhang,² Yongshui Fu,² and Shixing Tang¹

PARVOVIRUS (EqPV-H) associato a Theiler's Disease in horses

PLOS PATHOGENS

OPEN ACCESS

Citation: Tomlinson JE, Wolfisberg R, Fahnøe U, Sharma H, Renshaw RW, Nielsen L, et al. (2020) Equine pegiviruses cause persistent infection of bone marrow and are not associated with hepatitis. *PLoS Pathog* 16(7): e1008677. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008677>

Editor: David H. O'Connor, University of Wisconsin, UNITED STATES

Received: April 10, 2020

Accepted: June 2, 2020

Published: July 10, 2020

RESEARCH ARTICLE

Equine pegiviruses cause persistent infection of bone marrow and are not associated with hepatitis

Joy E. Tomlinson^{1*}, Raphael Wolfisberg^{2*}, Ulrik Fahnøe², Himanshu Sharma³, Randall W. Renshaw⁴, Louise Nielsen², Eiko Nishiuchi⁵, Christina Holm², Edward Dubovi⁴, Brad R. Rosenberg⁶, Bud C. Tennant⁷, Jens Bukh², Amit Kapoor³, Thomas J. Divers⁷, Charles M. Rice⁵, Gerlinde R. Van de Walle¹, Troels K. H. Scheel^{2,5*}

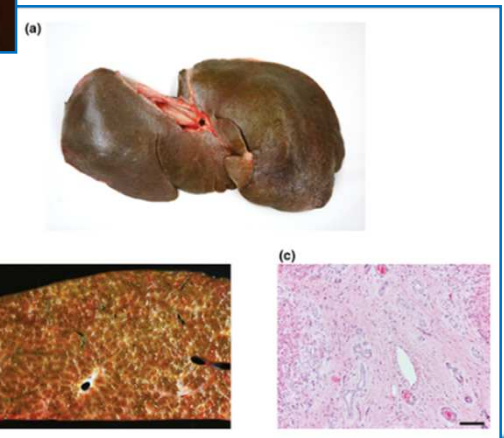
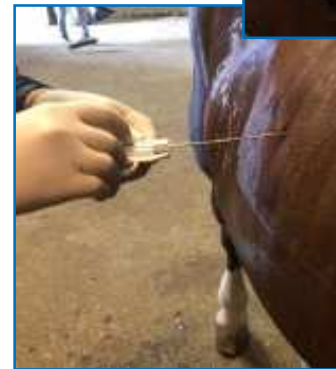


Since pegiviruses generally are not associated with clinical disease, it was a surprise when TDAV was found in an outbreak of acute serum hepatitis [13]. No additional links between EPgV-2 and clinical cases of equine liver disease have been reported; instead a recently discovered parvovirus (EqPV-H) appears responsible for a number of Theiler's disease cases in horses [36–41]. So far, however, the possible link between equine pegiviruses and hepatitis has not been formally examined. With the aim to investigate the natural history of EPgV infection and any further relation between TDAV/EPgV-2 and liver disease in horses, we here compared viral load, sequence diversity, persistence, tissue tropism, course of infection, and association to liver disease for EPgV-1 and -2 in horses.

- Prima segnalazione nel 2012 (Burbelo, 2012);
- causa infezioni generalmente non gravi con decorso subclinico o asintomatico.
- Può provocare:
 - **epatiti** acute con lieve incremento dei valori degli enzimi epatici quali GGT (gamma-glutamyl transferasi) e SDH (sorbitolo deidrogenasi). Raramente descritti stanchezza e calo delle performance nei cavalli infetti (Pacchiarotti, 2022);
 - occasionalmente epatite cronica con alterazione degli enzimi epatici e persistenza dell'infezione anche oltre i 6 mesi;
 - rari i casi gravi con exitus (naturale o per eutanasia) dei soggetti per grave compromissione dello stato di salute (es. in caso di co-morbidità o debilitazione).

HEPACIVIRUS equino

sintomatologia



by Tegtmeyer et al., 2019

HEPACIVIRUS equino






sintomatologia

- Prima segnalazione nel 2012 (Burbelo)
- causa infezioni generalmente non gravi con decorso subclinico e asintomatico
- Può
- epatiti degli trans Rara perfo
- occas altera dell'in
- rari eutar comp caso di co-morbidità o debilitazione del soggetto).

Order Article Reprints

Open Access Systematic Review

Equine Hepacivirus: A Systematic Review and a Meta-Analysis of Serological and Biomolecular Prevalence and a Phylogenetic Update

by  Giulia Pacchiarotti [†] ,  Roberto Nardini ^{*,†}  and  Maria Teresa Scicluna

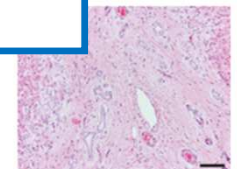
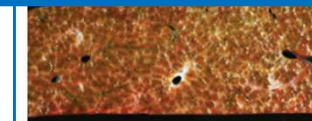
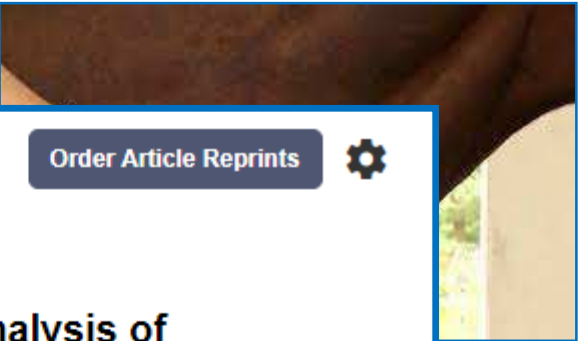
National Reference Center for Equine Diseases, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", via Appia Nuova 1411, 00178 Rome, Italy

* Author to whom correspondence should be addressed.
† These authors contributed equally to this work.

Animals **2022**, *12*(19), 2486; <https://doi.org/10.3390/ani12192486>

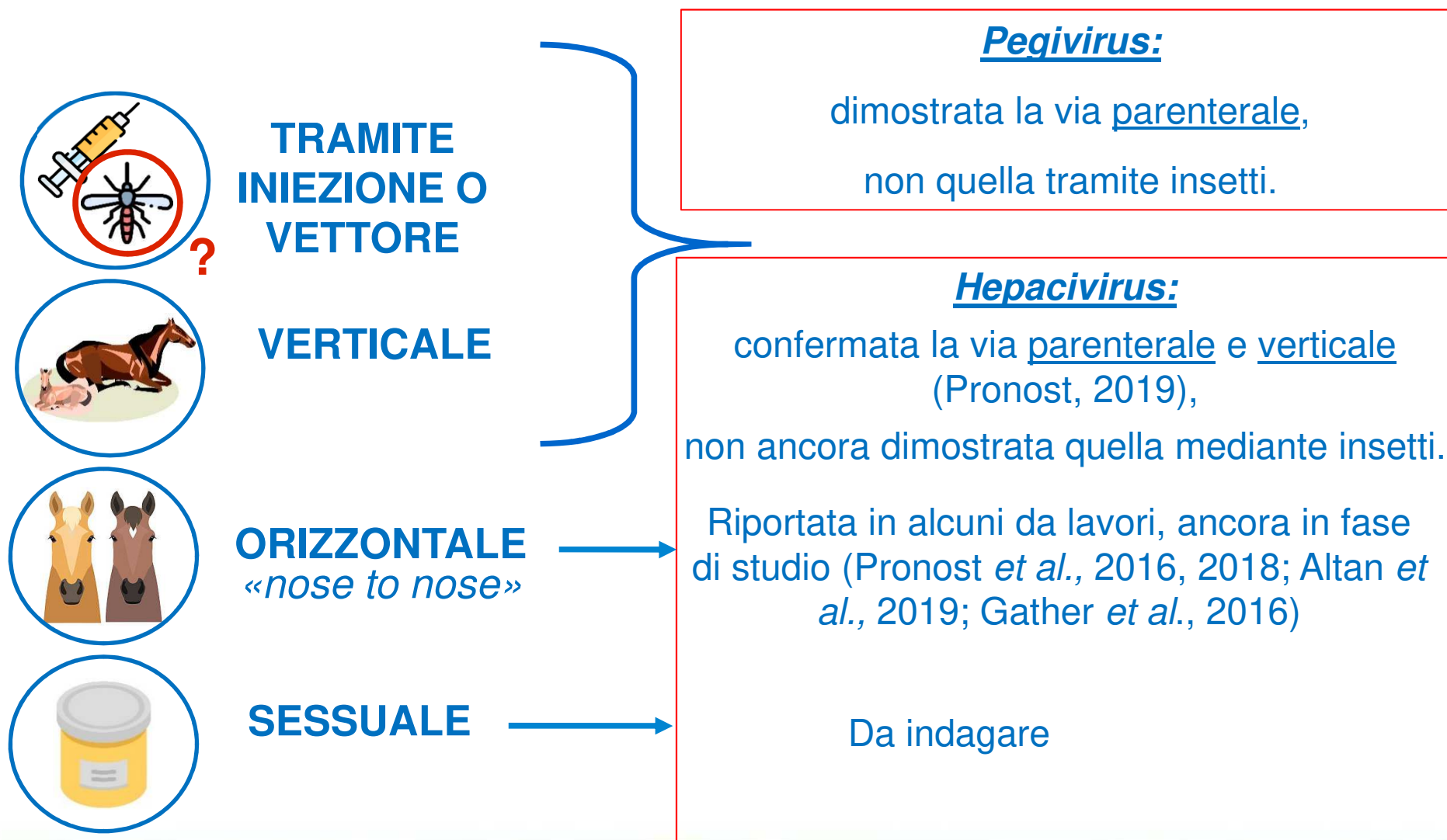
Received: 7 August 2022 / Revised: 13 September 2022 / Accepted: 16 September 2022 /
Published: 20 September 2022

(This article belongs to the Special Issue Hepatic Disease of Equids)



by Tegtmeyer et al., 2019

VIE DI TRASMISSIONE



EMODERIVATI

- ❖ La somministrazione di plasma iperimmune è una pratica spesso utilizzata per trattare puledri con sistema immunitario immaturo, o compromesso, al momento della nascita.
- ❖ La presenza di potenziali patogeni all'interno di pool di siero equino e prodotti commerciali emoderivati, sottolinea l'importanza di verificare la loro innocuità prima dell'immissione sul mercato, onde evitare la trasmissione di patogeni.

L'IMPORTANZA DELLA SICUREZZA DEI PRODOTTI AD USO VETERINARIO



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Frequent presence of hepaci and pegiviruses in commercial equine serum pools

Alexander Postel^a, Jessika-M. V. Cavalleri^b, Stephanie Pfaender^c, Stephanie Walter^c, Eike Steinmann^c, Nicole Fischer^d, Karsten Feige^b, Ludwig Haas^a, Paul Becher^{a,*}

^a Institute for Virology, Department of Infectious Diseases, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany

^b Clinic for Horses, University of Veterinary Medicine Hannover, Germany;

^c Institute for Experimental Virology, Twincore Centre for Experimental and Clinical Infection Research, Hannover, Germany

^d Institute for Medical Microbiology, Virology and Hygiene, University Medical Center Hamburg- Eppendorf, Hamburg, Germany



Contents lists available at ScienceDirect

Biologicals

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biologicals

Characterization of the viral genomes present in commercial batches of horse serum obtained by high-throughput sequencing

W.P. Paim^a, M.N. Weber^a, S.P. Cibulski^b, M.S. da Silva^a, D.E. Puhl^a, R.F. Budaszewski^a, A.P.M. Varela^c, F.Q. Mayer^d, C.W. Canal^{a,*}

^a Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brazil

^b Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia-CBiotec, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil

^c Equipe de Virologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

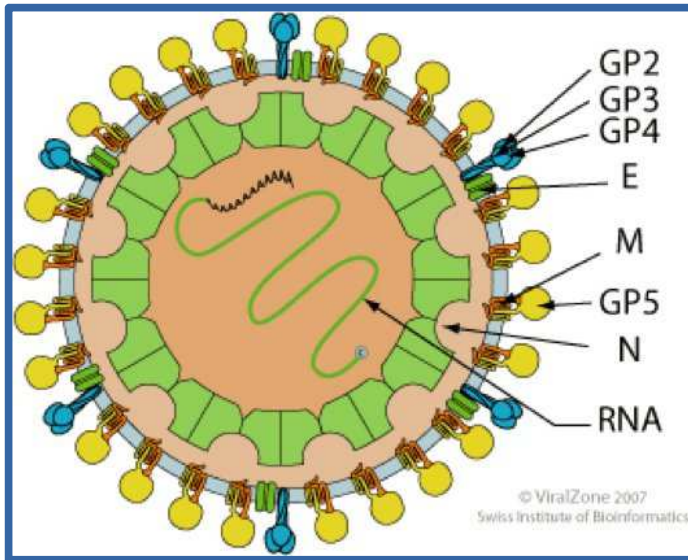
^d Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Eldorado do Sul, RS, Brazil

CONSIDERAZIONI EPIDEMIOLOGICHE

- EPgV-1 e 2: non sembra esistere un pattern preferenziale di infezione, o individui più suscettibili di altri;
- EqHV: alcune categorie mostrano prevalenze più alte es. **cavalli sportivi, femmine e puledri**: questi gruppi sembrano essere i più suscettibili alle infezioni da EqHV, con decorsi acuti ad evoluzione spesso benigna; solo nei puledri la durata si protrae per periodi più lunghi che possono superare i 6 mesi (Pacchiarotti et al., 2022).

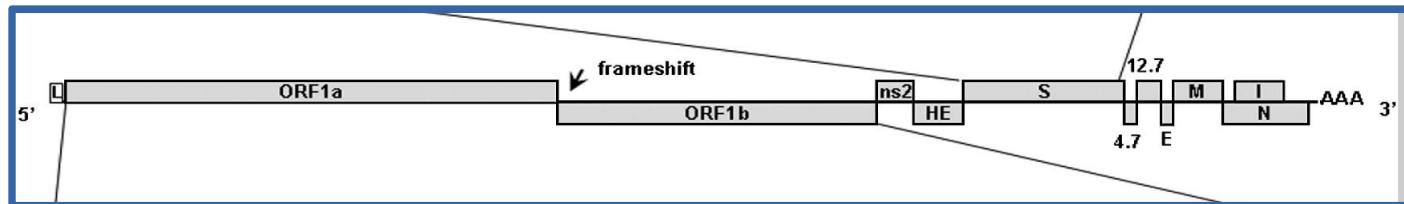


Coronavirus generico



- Virus a +ssRNA;
- Fam. CORONAVIRIDAE, Gen. Betacoronavirus.
- 2014: 1^a segnalazione in Europa (Miszczak, 2014).

Ne esistono molti sottotipi, ognuno tendenzialmente specifico per il suo ospite e le cellule bersaglio possono essere quelle del tratto o gastrointestinale respiratorio;



Genoma del Coronavirus Equino

Zhang *et al.*, 2007 – Genomic characterization of Equine coronavirus.

sintomatologia



- Trasmissione oro-fecale (ipotizzata anche mediante secrezioni nasali - Pusterla 2015 e 2019);
- Colpisce prevalentemente l'intestino causando diarrea, sindromi febbrili e manifestazioni enteriche. Rari i sintomi respiratori. Con il protrarsi della malattia possono comparire letargia, dimagrimento e apatia. Decorso generalmente benigno, rari i casi gravi.
- Matrici di elezione per le analisi: feci/tamponi rettali.

Characterization of a Coronavirus Isolated from a Diarrheic Foal

JAMES S. GUY,^{1*} JAMIE J. BRESLIN,¹ BABETTA BREUHAUS,² SALLY VIVRETTE,²
AND LYNDIA G. SMITH¹

Department of Microbiology, Pathology and Parasitology¹ and Department of Clinical Sciences,² College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27606

Received 13 June 2000/Returned for modification 30 August 2000/Accepted 24 September 2000

A coronavirus was isolated from feces of a diarrheic foal and serially propagated in human rectal adenocarcinoma (HRT-18) cells. Antigenic and genomic characterizations of the virus (isolate NC99) were based on serological comparison with other avian and mammalian coronaviruses and sequence analysis of the nucleocapsid (N) protein gene. Indirect fluorescent-antibody assay procedures and virus neutralization assays demonstrated a close antigenic relationship with bovine coronavirus (BCV) and porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (mammalian group 2 coronaviruses). Using previously described BCV primers, the N protein gene of isolate NC99 was amplified by a reverse transcriptase PCR (RT-PCR) procedure. The RT-PCR product was cloned into pUC19 and sequenced; the complete N protein of NC99 (446 amino acids) was then compared with published N protein sequences of other avian and mammalian coronaviruses. A high degree of identity (89.0 to 90.1%) was observed between the N protein sequence of NC99 and published sequences of BCV (Mebus and F15 strains) and human coronavirus (strain OC43); only limited identity (<25%) was observed with group 1 and group 3 coronaviruses. Based on these findings, the virus has been tentatively identified as equine coronavirus (ECV). ECV NC99 was determined to have close antigenic and/or genetic relationships with mammalian group 2 coronaviruses, thus identifying it as a member of this coronavirus antigenic group.

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect

Virology 369 (2007) 92–104

VIROLOGY

www.elsevier.com/locate/yviro

Genomic characterization of equine coronavirus

Jianqiang Zhang^a, James S. Guy^b, Eric J. Snijder^c, Doug A. Denniston^a,
Peter J. Timoney^a, Udeni B.R. Balasuriya^{a,*}



ELSEVIER

Veterinary Microbiology

Volume 171, Issues 1–2, 25 June 2014, Pages 206–209



Short Communication

First detection of equine coronavirus (ECoV) in Europe

Fabien Miszczak^{a, b, c, d}, Vincent Tesson^{a, b, c}, Nathalie Kin^{a, b, c}, Julia Dina^{a, b, c}, Udeni B.R. Balasuriya^e,
Stéphane Pronost^{a, b, d}, Astrid Vabret^{a, b, c}

PROGETTI DI RICERCA

- **RC IZSLT 10/18:** 'Indagine sulla diffusione di Nonprimate Hepaciviruses (NPHV) negli equidi italiani e valutazione del rischio di trasmissione con l'impiego della medicina trasfusionale in campo veterinario'
- **RC IZSLT 09/20:** 'Sviluppo e messa a punto di metodi per la diagnostica genetica e per le malattie infettive virali emergenti e riemergenti degli equini'



LO STUDIO

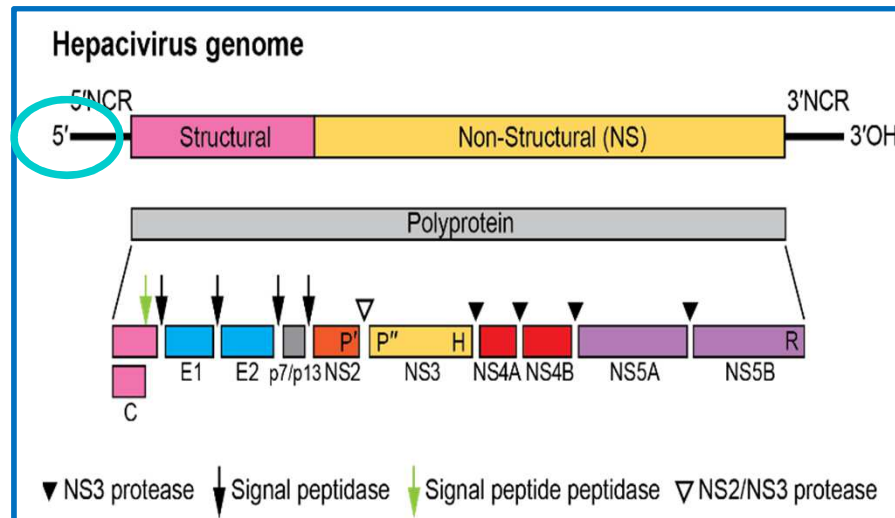
Hepacivirus

- ❖ Popolazione distribuita nell'intero territorio nazionale
- ❖ Tipologia aziende: 4 categorie produttive più rappresentate in Italia (vedi tabella: EQ, IPP, PCL, RIP)
- ❖ N° campioni attesi: 2000 - Criterio: ES 5%; IC 95%
- ❖ N° campioni raccolti e analizzati (al 2022): 1801



INDIRIZZO PRODUTTIVO	SIGLA
<ul style="list-style-type: none">• Equestre con fattrici• Equestre senza fattrici• Maneggio	EQ
<ul style="list-style-type: none">• Ippico con fattrici• Ippico senza fattrici• Ippodromo	IPP
<ul style="list-style-type: none">• Carne con fattrici• Carne senza fattrici• Produzione senza fattrici• Lavoro	PCL
<ul style="list-style-type: none">• Riproduzione	RIP





❖ Hepacivirus (EqHV):

Metodo: Real Time PCR

Target: frammento **5'UTR**

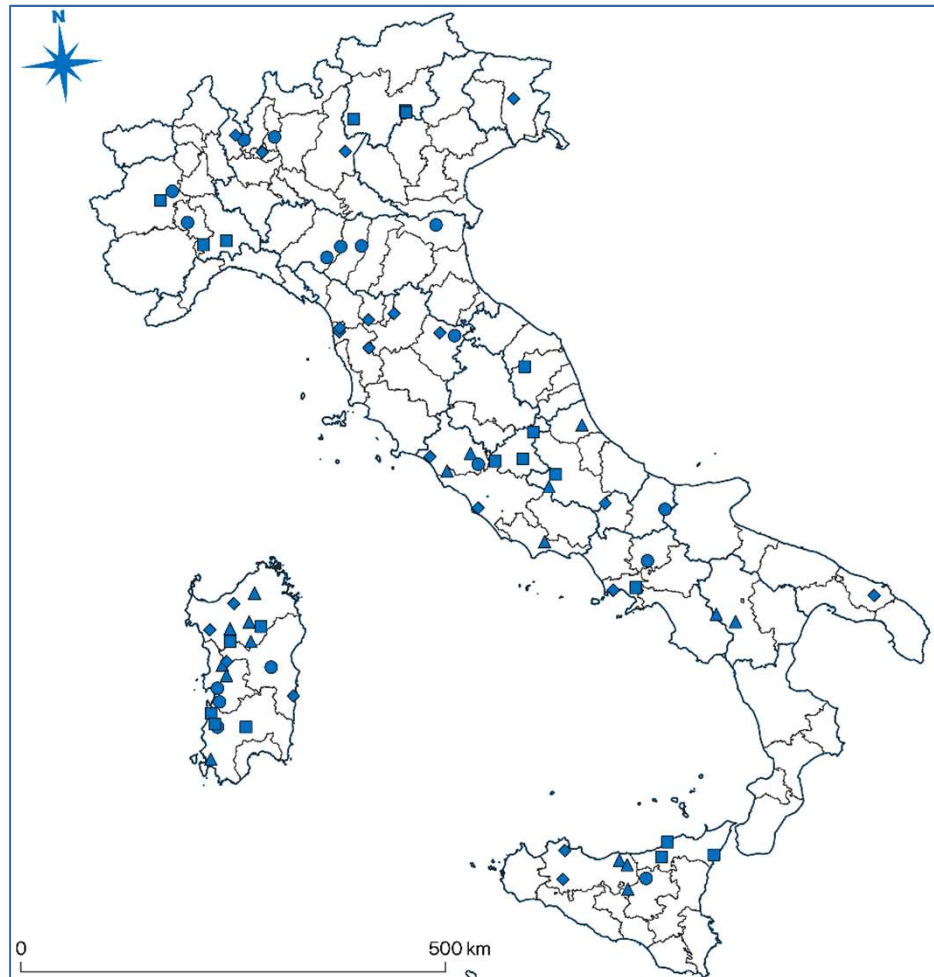
Riferimento: Burbelo *et al.*, 2012

❖ Matrice: siero



I DATI IN ITALIA

Equine Hepacivirus



Prevalenza: 4,27% (77/1801)

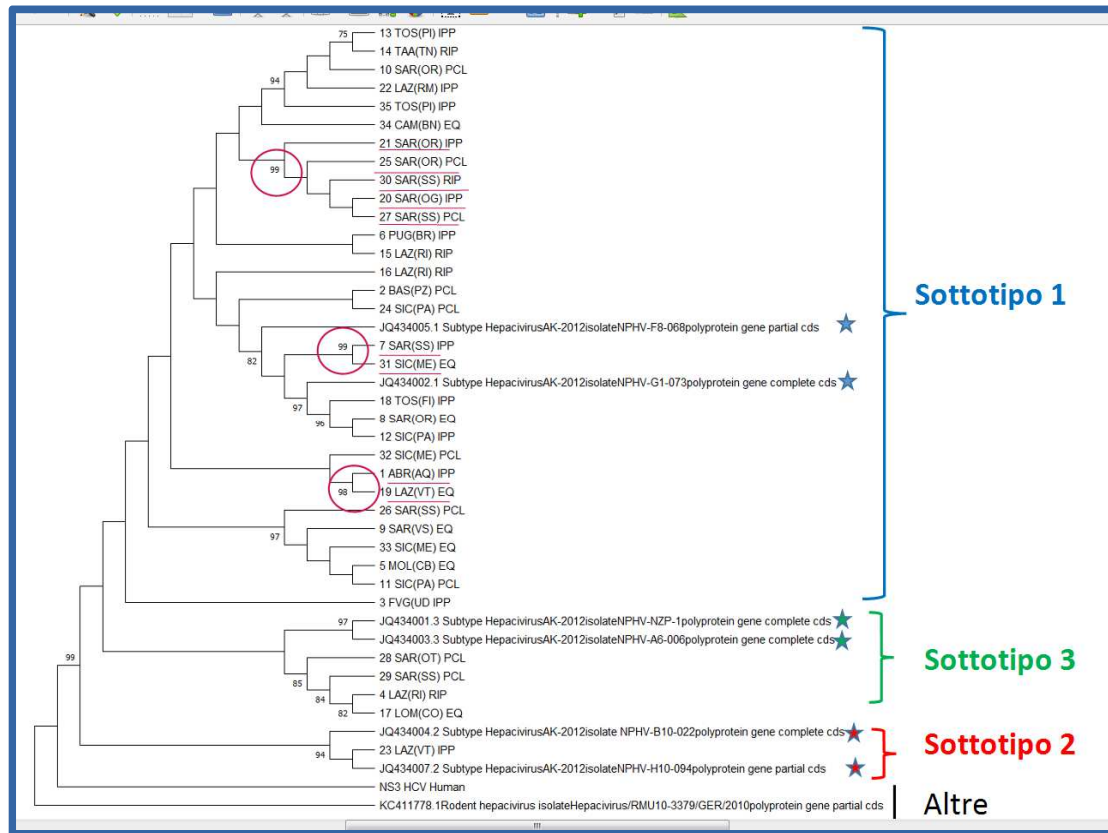
- EQ: 17/77 (22%)
- IPP: 23/77 (30%)
- PCL: 17/77 (22%)
- RIP: 20/77 (26%)

**% POSITIVITÀ
RISCONTRATE IN LINEA CON
DATI RIPORTATI IN
LETTERATURA (4, 7% - Elia *et al.*, 2017).**



I DATI IN ITALIA

I dati del sequenziamento per Equine Hepacivirus



❖ *EqHV*:

Metodo: PCR endpoint

Target: frammento **NS3**

Riferimento: Schlottau *et al.*,
2019

Frammento
di 607 bp

Dati non pubblicati

Al momento confermati in sequenziamento 35 campioni, distribuiti nei 3 sottotipi noti in letteratura

LO STUDIO

RC IZSLT 09/20

Pegivirus

Popolazione distribuita sull'intero territorio nazionale.

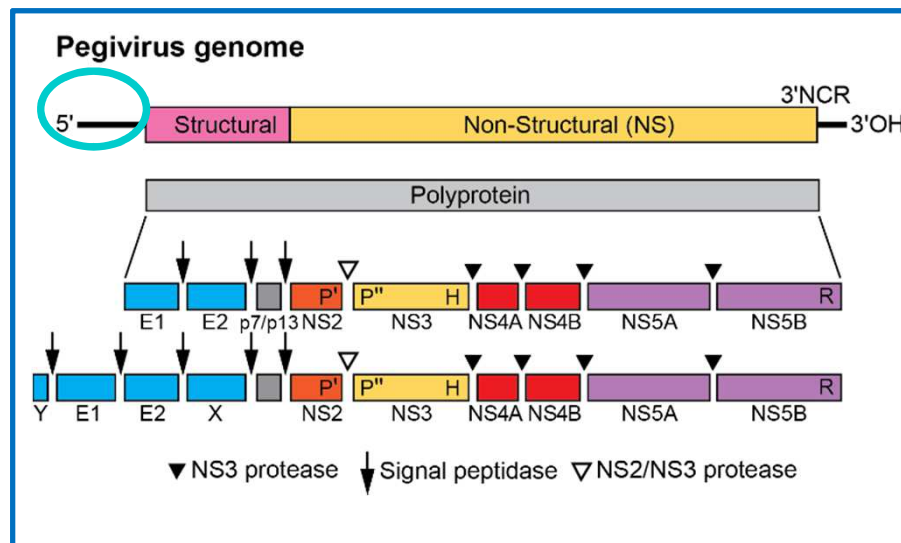
- ❖ N° soggetti registrati: 1103
- ❖ N° soggetti sottoposti a prelievo: 1068
- ❖ Matrici utilizzate: siero (EPgV) e tampone rettale (EcoV)



SCENARI DI NUMEROSITA' CAMPIONARIA SU 1068 INDIVIDUI:

- 1) Con un ES del 5% e una IC del 95%, da testare : 443
- 2) Con un ES del 10% e una IC del 95%, da testare : 161
- 3) Con un ES del 10% e una IC del 90%, da testare : 116
(selezione random per ogni infezione considerata)





❖ Pegivirus (EPgV-1, EPgV-2):

Metodo: Duplex Real Time PCR

Target: frammento **5'UTR**

Riferimento: Postel *et al.*, 2016

❖ Matrice: siero

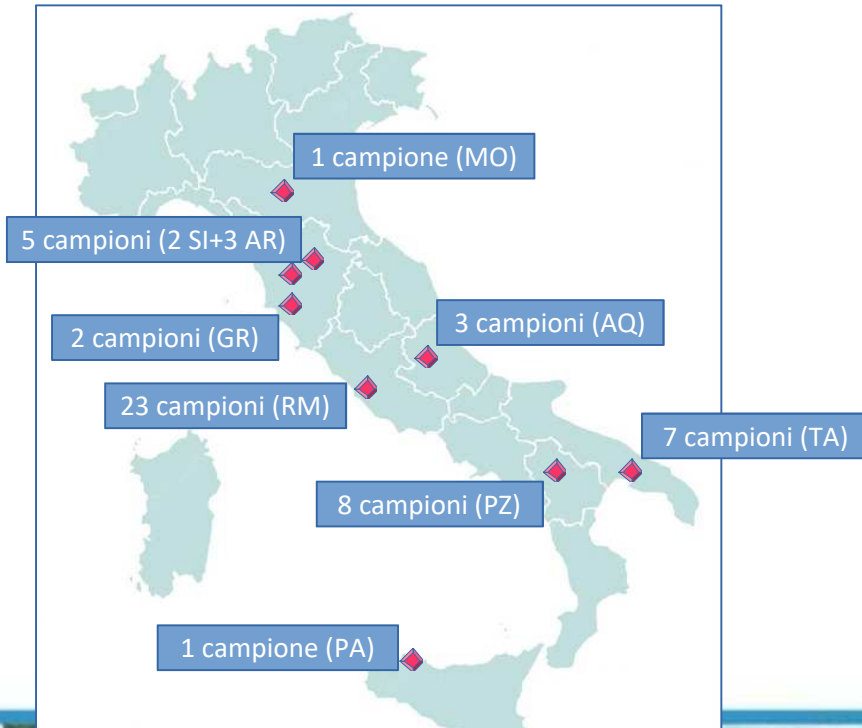


I DATI IN ITALIA

Equine Pegivirus (EPgV-1, EPgV-2)

- Primi dati riportati per l'Italia
- Dati di prevalenza coerenti con quelli descritti in letteratura

EPgV - 1: 8,58% (38/443)



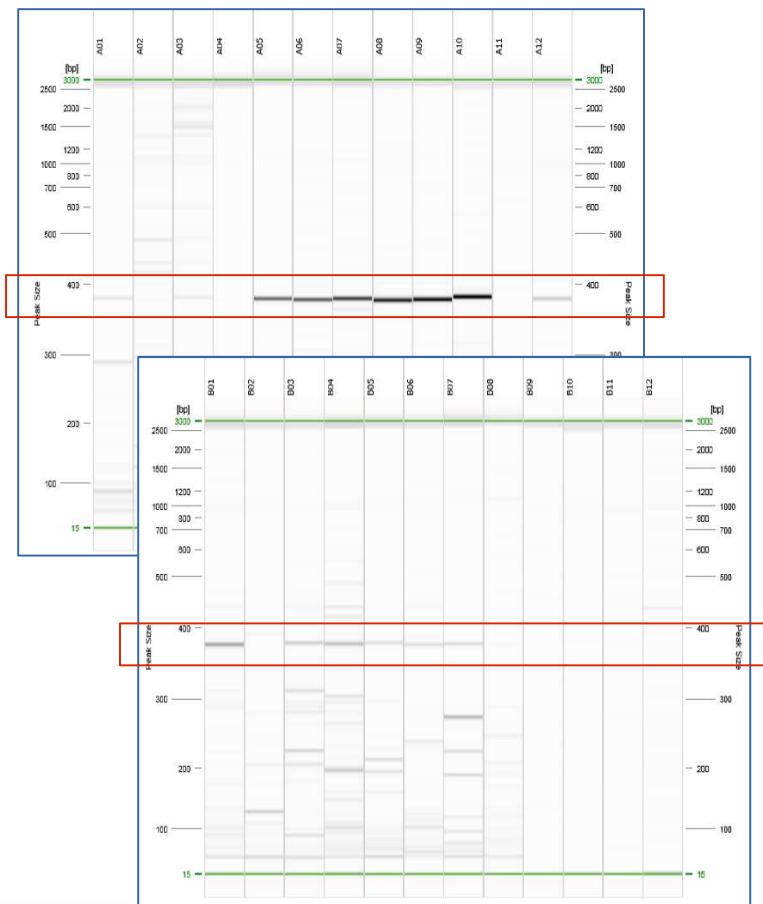
EPgV - 2 : 2,03% (9/443)



N°2 campioni, uno proveniente da Grosseto e uno da Potenza hanno mostrato positività per entrambi i Pegivirus;

I DATI IN ITALIA

Equine Pegivirus - dati preliminari del sequenziamento



❖ Pegivirus (EPgV-1, EPgV-2):

Metodo: PCR endpoint

Target: frammento **NS3**

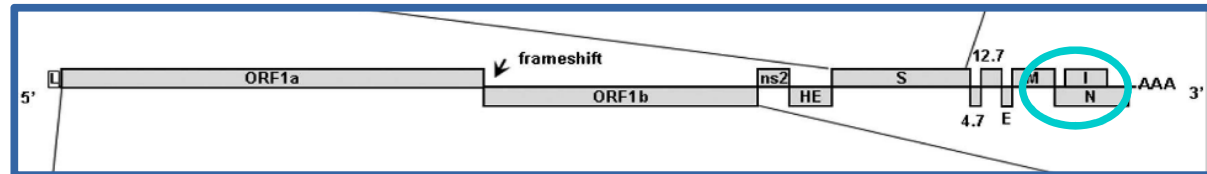
Riferimento: Postel *et al.*, 2016

Frammento
di 355 bp

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show 100					
<input checked="" type="checkbox"/> select all 39 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Theiler's disease-associated virus strain F10 NS3 gene, partial cds	Theiler's disease-associated virus	523	523	99%	7e-144	93.24%	355	KY922949.1
<input checked="" type="checkbox"/> Theiler's disease-associated virus strain F11 NS3 gene, partial cds	Theiler's disease-associated virus	512	512	99%	1e-140	92.68%	355	KY922950.1
<input checked="" type="checkbox"/> Theiler's disease-associated virus strain F9 NS3 gene, partial cds	Theiler's disease-associated virus	512	512	99%	1e-140	92.68%	355	KY922948.1

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download		Select columns	Show 100					
<input checked="" type="checkbox"/> select all 17 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Equine Pegivirus 1 isolate C0035, complete genome	Equine pegivirus 1	141	141	24%	8e-29	95.45%	11197	KC410877
<input checked="" type="checkbox"/> Equine pegivirus 1 isolate C35 polyprotein gene, complete cds	Equine pegivirus 1	141	141	24%	8e-29	95.45%	11198	MT276211.1
<input checked="" type="checkbox"/> Equine pegivirus 1 isolate B7 NS3 gene, partial cds	Equine pegivirus 1	121	121	21%	1e-22	94.74%	313	KT795392.1
<input checked="" type="checkbox"/> Equine pegivirus 1 isolate M8 NS3 gene, partial cds	Equine pegivirus 1	121	121	21%	1e-22	94.74%	313	KT795388.1

➡ Al momento confermati in sequenziamento 9 campioni, gli altri in corso



❖ Coronavirus (Eq-Cov):

Metodo: Real Time PCR

Target: **gene N**

Riferimento: Pusterla *et al.*, 2013

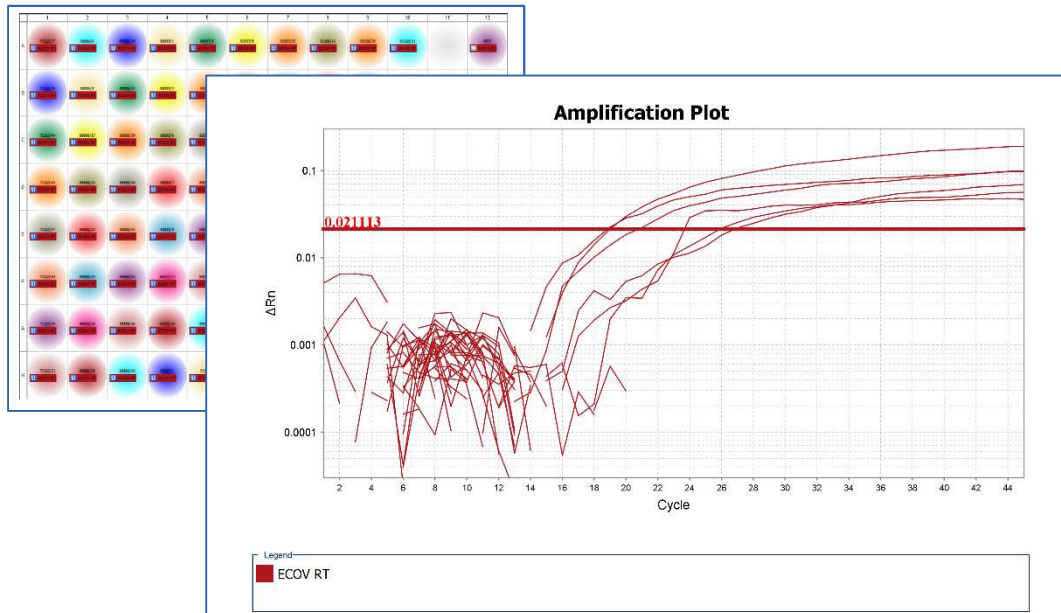
❖ Matrice: tampone rettale



I DATI IN ITALIA

Equine Coronavirus

I campioni risultati positivi dall'analisi in Real-Time PCR (tamponi rettali) sono in fase di conferma attraverso sequenziamento (Drzewniokova et al., 2021):



E-Cov: 3,61% (16/443)



**SEQUENZIAMENTO
IN CORSO**

- Campionamenti su popolazioni apparentemente sane/asintomatiche si attestano su percentuali simili (Nemoto 2015: 2,5%).
- Molti altri studi hanno analizzato individui sintomatici/focolai con % più alte.



CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

- Pegivirus: raccolta di dati preliminari sulla presenza delle infezioni da EPgV 1 e 2 nel territorio nazionale
- Coronavirus: prima indagine sulla presenza di infezione sul territorio nazionale
- Hepacivirus: disponibilità dei primi dati di prevalenza a livello nazionale e per indirizzo produttivo
- Possibilità di aggiornamento dei protocolli diagnostici
- Inserimento dei protocolli acquisiti nello screening degli emoderivati



Thank you

Ringrazio tutto il personale della UOC Virologia per il contributo nel lavoro svolto

