



**PROGETTO IZSLT 16/11: “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”.**

## **RESOCONTO DATI 2013 E PROSPETTO ATTIVITÀ 2014**

Nel corso dell'anno 2013 sono stati perseguiti tutti e tre gli obiettivi prefissati dal progetto.

Gli obiettivi sono i seguenti:

- 1. Definire le prevalenza rispettivamente per *B. caballi*, *T. equi* ed *A. phagocytophilum* in popolazioni autoctone del Lazio e della Toscana.**
- 2. Realizzazione di un algoritmo diagnostico impiegato per il miglioramento della sensibilità e specificità diagnostica per le sindromi anemico/emolitiche dell'equino.**
- 3. Studio caso/controllo per l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi/anaplasmosi**

Per quanto riguarda lo studio di prevalenza sono stati analizzati i sieri di 852 animali in collaborazione con la facoltà di Medicina Veterinaria di Napoli Federico II. Di questi 671 sono cavalli; 179 asini e 2 muli. Le razze più rappresentate sono, in ordine decrescente: Sella, Meticcio, Pony, Quarter horse, Trottatore, Appaloosa, Salernitano, Maremmano, Purosangue, Anglo arabo, TPR. Riguardo al sesso, 228 sono castroni, 329 femmine e 116 maschi interi. Quasi tutti gli asini non riportavano l'indicazione della razza. L'età media è risultata essere di 10 anni. I sieri sono stati analizzati per *Babesia caballi* e *Theileria equi*, in ELISA ed in IFI. Le percentuali di positività riscontrate sono state del **8%** per *Babesia caballi* e del **43,8%** per *Theileria equi*. Questa differenza tra i due parassiti può essere spiegata con il fatto che gli anticorpi per Babesia possono persistere per circa quattro anni, mentre quelli per Theileria anche per tutta la vita dell'animale. Questo dato è stato confermato anche dall'analisi dei campioni inviati all'Istituto con sospetto clinico nel biennio 2012/2013: la percentuale di positività per *Babesia caballi* è risultata tra il **3%** e il **5%** e per *Theileria equi* intorno al **30%**. Questa considerazione può essere utile anche per interpretare il **7%** di sieropositività contemporanee per entrambi i parassiti.

**Considerazione 1: il solo esito sierologico positivo per Babesia o Theileria, in assenza di positività parassitologica (striscio ematico o ricerca biomolecolare) fornisce indicazioni insufficienti al fine di decidere se il soggetto debba o no iniziare la terapia farmacologica, pertanto la visita clinica e l'anamnesi rivestono ancora un ruolo determinante.**

Per valutare la concordanza tra i due test sierologici disponibili (ELISA ed IFI) sono stati analizzati con entrambi i metodi 91 asini. Per *Babesia caballi* sono risultati tutti negativi in ELISA, mentre in IFI sono risultati 83 negativi, 7 positivi e un non conclusivo. Per *Theileria equi* sono risultati negativi ad entrambi i metodi 29 soggetti, positivi ad entrambi i metodi 51 soggetti, mentre 10 hanno ottenuto dei risultati discordi. Contestualmente, nell'ambito dello studio caso/controllo, che sarà trattato successivamente, sono stati analizzati con entrambi i metodi 32 soggetti per *Theileria* e 29 soggetti per *Babesia*. Per *Babesia caballi* tutti i campioni sono risultati negativi in ELISA, mentre 8 sono risultati positivi in IFI. Per *Theileria equi* 6 campioni sono risultati negativi ad entrambi i test, 12 positivi ad entrambi, mentre 13 sono risultati negativi ELISA e positivi IFI e uno positivo ELISA e negativo IFI. Le cause di queste incongruenze restano da analizzare. Le ipotesi da indagare sono: l'IFI possiede una maggiore sensibilità o una minore specificità rispetto all'ELISA; la struttura antigenica presente nel kit ELISA non riesce a riconoscere tutti i positivi. L'ultima ipotesi potrebbe essere imputata al fatto che la struttura antigenica non sia perfettamente identica agli antigeni circolanti in Italia, in quanto potrebbero circolare anche parassiti diversi; o perché il soggetto produce anticorpi nei confronti di questi antigeni in fase tardiva d'infestazione.

**Considerazione 2: la discordanza tra tecniche sierologiche differenti è una caratteristica intrinseca delle prove, indipendente dalla competenza del laboratorio. Uno degli scopi del progetto è anche quello di chiarire i criteri d'interpretazione dei test sierologici.**

Riguardo alla diagnosi biomolecolare sono stati messi a punto 6 differenti protocolli di PCR, 3 per ciascun parassita. Queste PCR rilevano la presenza di differenti porzioni del genoma parassitario, e si stanno ottimizzando per valutare lo stato di sterilizzazione dell'animale anche a seguito di terapia e per fornire indicazioni sulla fase d'infestazione

mediante una quantificazione del parassita.

**Considerazione 3: la diagnosi molecolare, una volta messi a punto i protocolli descritti, può avere la capacità di valutare lo stato di sterilizzazione dell'animale anche a seguito di terapia e per fornire indicazioni sulla fase d'infestazione mediante una quantificazione del parassita.**

L'altra branca di ricerca consistente nell'ambito del progetto è lo studio caso/controllo per lo studio dei fattori di rischio e l'identificazione di parametri diagnostici utili alla definizione dello stato clinico del soggetto affetto da piroplasmosi. A questo scopo con la vostra collaborazione sono stati raccolti 101 casi sospetti di sindromi anemico emolitiche, con diagnosi differenziale tra piroplasmosi, anaplasmosi, leptospirosi e anemia infettiva equina. Di questi soggetti sono stati raccolti dati anamnestici secondo la scheda di raccolta dati e sono state effettuate diverse analisi sierologiche, ematobiochimiche e biomolecolari. In particolare: Anaplasma, Babesia, Theileria, Leptospira (sierologico e ricerca antigene), Anemia Infettiva Equina (sierologico), Striscio ematico periferico, AST, Creatinina, GGT, CPK, BUN, LDH, Radicali liberi (D-roms), Antiossidanti, Bilirubina Totale e Diretta, Emocromo completo con formula, Conta CD4 e CD8.

Gli scopi sono principalmente due:

1. Identificare i fattori di rischio, intesi come caratteristiche anamnestiche o gestionali, che sono presenti in maniera significativa nei casi confermati rispetto al gruppo di sospetti non confermati (controlli).
2. Identificare le analisi ematobiochimiche e successivamente anche la direzione della loro variazione, che sono più indicative di un'infestazione da piroplasma all'interno della popolazione dei sospetti.

Nel 2013, i campioni raccolti, per alcune caratteristiche anamnestiche, sono risultati molto omogenei, non permettendo ad oggi l'analisi di alcuni fattori di rischio: ad esempio la quasi totalità dei soggetti riporta come razza: SELLA e come attitudine: EQUESTRE/IPPICO. Non avendo un numero sufficiente di campioni con differenti indicazioni di razza e attitudine, non potremmo confermare se tali fattori siano significativi.

Inoltre, le schede spesso non riportavano tutti i dati richiesti con conseguente perdita di dati utilizzabili per il confronto statistico.

Per quanto riguarda i rilievi ematobiochimici, alcuni parametri sono risultati indicativi nel distinguere un soggetto affetto da piroplasmosi all'interno di un gruppo di soggetti sospetti. In particolare, delle analisi suddette, sono risultati indicativi l'emocromo con formula, il

protidogramma e la bilirubina indiretta.

Dei 101 casi sospetti, si sono confermati con presenza di parassita, o mediante l'esame dello striscio o mediante la PCR, 32 soggetti, di cui 25 casi di Theileria, 2 casi di Babesia, 1 caso di coinfezione e 4 casi di piroplasmosi senza possibilità di identificare il parassita.

Riguardo alle altre patologie indagate si sono riscontrate 3 sieropositività per Anaplasma e una per Leptospira. Nessuna di queste è stata confermata in PCR.

L'attività del 2014 servirà ad approfondire e confermare questi dati, anche attraverso l'esame di cavalli sani senza sintomatologia. Pertanto, è indispensabile continuare nel reclutamento sia di sospetti clinici, come avvenuto nel 2013, che di soggetti asintomatici. Tali soggetti costituiranno i controlli negativi dello studio caso-controllo e devono essere reclutati possibilmente in rapporto massimo di 2:1 rispetto ai sospetti.

**Considerazione 4: nella raccolta campioni 2014 si richiede a voi colleghi di continuare ad inviare i campioni prelevati ai casi in quantità sufficiente (18 ml di sangue con EDTA e 18ml di sangue senza anticoagulante). Si ribadisce la necessità di compilare completamente e correttamente la scheda. In caso di scheda non compilata correttamente e completamente o di prelievi insufficienti, le analisi riportate saranno poste a pagamento.**

**Considerazione 5: ai fini dello studio caso controllo, si richiede di effettuare per ogni caso/sospetto, ove possibile, un prelievo contestuale anche a due soggetti non sintomatici. Se non è possibile prelevarli contestualmente al sospetto, potranno essere reperiti in un'altra struttura con simili caratteristiche gestionali. Volendo valutare razza e attitudine come fattore di rischio, si richiede di reclutare casi e controlli con razza e attitudine differenti rispetto a Sella ed Equestre/Ippico.**

**Considerazione 6: sulla base delle considerazioni preliminari, il panel di analisi a disposizione gratuitamente è cambiato rispetto allo scorso anno, razionalizzando e focalizzando la scelta. Nel 2014 saranno effettuate le seguenti analisi: Anaplasma, Babesia, Theileria, Leptospira (sierologico e ricerca antigene), Anemia Infettiva Equina (sierologico), Striscio ematico periferico, AST, GGT, CPK, Bilirubina Totale e Diretta, Emocromo completo con formula, Protidogramma. Eventuali ulteriori richieste aggiuntive saranno poste a pagamento.**