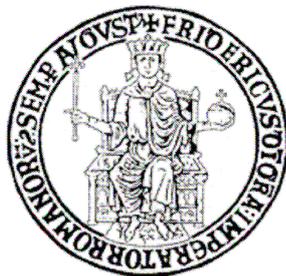


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA
VETERINARIA
- XXVI CICLO -**

**ANEMIA INFETTIVA EQUINA: STUDIO CLINICO, EMATOLOGICO,
SIEROLOGICO E VIROLOGICO IN MULI NATURALMENTE INFETTI A
SEGUITO DI TRATTAMENTO IMMUNODEPRESSIVO**

Coordinatore

Ch.mo Prof. Giuseppe Cringoli

Tutor **Ch.mo Prof. Ugo Pagnini**

Co-tutor **Dr. Gian Luca Autorino**

Dottorando

Dr. Raffaele Frontoso

Anni Accademici 2011-12/2013-14

Ringraziamenti

Indice	pagine
Riassunto	4
Anemia Infettiva Equina: caratteristiche della malattia	6
Situazione epidemiologica Nazionale	15
Confronto del rischio per Anemia Infettiva Equina tra cavalli e muli	22
 Sezione Sperimentale	
Premessa	28
Obbiettivo della tesi	30
Materiali e Metodi	
✓ arruolamento animali	31
✓ raccolta campioni per esami di laboratorio	35
✓ conta piastrinica	36
✓ Immunosoppressione farmacologica	37
○ Valutazione dell'immunosoppressione	37
✓ Analisi sierologica	39
✓ Analisi virologica	44
○ Stima della carica virale plasma associata	44
✓ Messa a punto del controllo interno per la qRT-PCR	46
✓ Real time PCR per EHV-1 e 4	47
✓ Sequenziamento dei amplificati ottenuti alla nested-PCR	48
Risultati	
✓ profilo clinico e verifica della immunosoppressione farmacologica	50
✓ risposta sierologica	60
✓ stima della carica virale mediante RT-PCR quantitativa	65
✓ sequenziamento dei prodotti della Nested –PCR	69
Discussioni	70
Conclusioni	76
Bibliografia	78

Riassunto

L'anemia infettiva equina è un'importante malattia virale che colpisce gli equidi. L'agente eziologico responsabile è un virus a RNA appartenente alla famiglia *Retroviridae* genere *Lentivirus*. L'anemia infettiva equina (AIE) si trasmette principalmente tramite inoculazione di sangue infetto soprattutto ad opera di insetti ematofagi vettori o per inoculazione iatrogena e utilizzo di emoderivati contaminati dal virus. In Italia sono stati registrati numerosi focolai a partire dal 2007 anno in cui è iniziato il programma di sorveglianza conclusosi nel 2012. Nel corso della suddetta attività di sorveglianza è stata osservata una sieroprevalenza marcatamente più elevata nei muli.

Al fine di migliorare l'efficienza del programma Nazionale di Sorveglianza dell'Anemia Infettiva Equina (AIE) in Italia il Centro di Referenza per l'AIE (CRAIE) istituito presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT) ha adottato un sistema diagnostico a tre livelli basato sull'utilizzo in serie di tre test diagnostici: ELISA, AGID e Immunoblotting (IB). Dall'esame di circa 74880 campioni, principalmente raccolti da due regioni del centro Italia è emerso che 44 animali risultavano negativi al test AGID ma positivi al test ELISA/IB. La maggior parte di questi pattern di reattività sierologica (AGID negativi ELISA/IB positivi) sono state osservati nei muli. Considerata la scarsità di lavori scientifici riguardante gli aspetti epidemiologici, eziologici e clinici della malattia nei muli è stato eseguito uno studio osservazionale per meglio comprendere il ruolo del mulo nella persistenza e diffusione dell'infezione. Lo studio è stato incentrato sull'evoluzione clinica, ematologica, sierologica e virologica dell'AIE in muli naturalmente infetti a seguito di un trattamento farmacologico immunosoppressivo,

volto alla riattivazione virale. Il presente lavoro rappresenta il primo studio sulla riattivazione farmacologica dell'AIE in muli naturalmente infetti.

Anemia Infettiva Equina: caratteristiche della malattia

L'anemia infettiva equina (AIE) o “febbre delle paludi”, come era indicata agli inizi del novecento, è un'importante malattia virale che colpisce gli equidi (cavallo, asino, mulo e bardotto) caratterizzata da una febbre intermittente, anemia e dimagrimento progressivo dell'animale fino alla morte nei casi più gravi.

Segnalata per la prima volta nel 1843 in Francia (Lignee, 1843). Nel 1904 Carre' e Valle' descrissero in modo più dettagliato la malattia differenziandone l'evoluzione in acuta, subacuta e cronica e notarono che la malattia era causata da un agente filtrabile. Nello stesso studio i due autori francesi riprodussero l'infezione sperimentalmente mediante l'inoculazione di piccoli quantitativi di sangue da un cavallo ad un asino e dimostrarono che gli equidi restano portatori anche dopo risoluzione della forma clinica (Vallè e Carrè, 1904), solo più tardi si comprese che nei soggetti asintomatici, il genoma provirale rimane nei monociti del plasma e sangue periferico. Attualmente la malattia presenta una distribuzione quasi ubiquitaria, essendo stata riportata nel Continente Africano, Americano ed Euroasiatico.

In condizioni naturali la principale via di trasmissione è mediata dagli insetti vettori, in particolare i Tabanidi e pertanto la trasmissione è condizionata dalla stagionalità del vettore biologico. La via di trasmissione più efficiente e importante è rappresentata dalla via iatrogena, attraverso strumenti contaminati ed emoderivati. I casi di *AIE* verificatisi nel 2006 in Toscana ed Irlanda, furono associati all'utilizzo di emoderivati non controllati (More et al., 2008a, 2008b, 2008c).

La via iatrogena sembra essere la via di trasmissione più efficiente. Studi scientifici hanno quantificato il volume di sangue che residua nell'apparato buccale di una mosca cavallina di medie dimensioni che è pari a 0,00001ml (Foil e al. 1987),

rispetto a quello che può rimanere in un ago ipodermico o su un dito di un operatore dopo aver pulito il sangue residuo in seguito a prelievo ematico giugulare che può avere un volume stimato di sangue tra 0,05 e 0,1 ml. In questo caso strumenti contaminati come il riutilizzo di un ago che può veicolare una quantità di sangue tra le $5 \cdot 10^3$ - 10^4 volte superiore a quella di un tafano risulta estremamente efficiente come via di trasmissione. Inoltre l'infettività virale nell'apparato buccale di un insetto si riduce del 99% dopo appena un'ora fino a scomparire completamente dopo 4 ore dal pasto di sangue dell'insetto, per contro il virus dell'AIE rimane vitale per almeno 96 ore in un ago ipodermico (Williams e al., 1981)

Recentemente è stata anche ipotizzata la trasmissione con aerosol di sangue di soggetti con alti titoli virali affetti da grave epistassi. (more e al. 2008b)

Studi sperimentali volti a riprodurre l'infezione sono stati prevalentemente condotti nelle specie equina e asinina. Infezioni sperimentali sono state eseguite in passato per confermare lo stato di portatore in cavalli che registravano reazioni falsamente negative al test AGID e per valutare la relazione esistente tra i risultati dell'AGID e la viremia da AIE negli equidi (Cook e al., 2013)

L'AIE, dopo un periodo d'incubazione variabile che oscilla generalmente tra 1 e 3 settimane, ma può durare fino a 3 mesi, insorge come infezione di tipo acuto che si risolve generalmente in pochi giorni, e poi evolve in una forma asintomatica attraverso un'infezione cronica attiva, caratterizzata da episodi ricorrenti di febbre, trombocitopenia e anemia, associati a marcata replicazione del virus. Emorragie, edema e ittero prevalgono nella forma acuta dell'infezione in associazione a valori di temperatura rettale superiori a 39°C e valori nel conteggio delle piastrine inferiori a 1×10^5 / μl . Studi scientifici hanno dimostrato come i segni clinici della malattia compaiano quando la carica virale raggiunge un valore soglia che in infezioni

sperimentali di cavalli e pony corrispondono a $5 \cdot 10^7$ fino a $1 \cdot 10^8$ copie di RNA/ml (Cook e al., 2003). Al riguardo si evidenzia che il valore soglia dipende dal ceppo virale, dalla resistenza innata dell'animale alla malattia e dalla specie di equide. In uno studio comparativo utilizzando un ceppo virulento dell'AIE, cavalli o pony (*E. caballus*) hanno manifestato una forma clinica di malattia da severa a letale, per contro asini infettati allo stesso modo (*Equus asinus*) sono rimasti clinicamente normali con un picco viremico mille volte inferiore a quello di *E. caballus* (Cook et al., 2001). Al momento non è noto se gli asini sono intrinsecamente resistenti alla malattia o se in passato questo virus è stato adattato ad una specie di equide e pertanto nono replica in maniera ottimale in un'altra.

Tuttavia ceppi di AIE derivati da cavalli presentano un'equivalente tasso di replicazione in cellule macrofagiche (monociti derivati) sia di cavallo che di asino (Cook et al., 2001) suggerendo che il meccanismo protettivo negli asini non dipenda solamente da una restrizione cellulare dell'ospite asinino.

I segni clinici associati con la forma acuta dell'AIE sono mediati dalle citochine infiammatorie come il tumor necrosis factor alpha ($TNF\alpha$), l'interleuchina 6 (IL-6) e il transforming growth factor b ($TGF\beta$) che vengono rilasciati quando la carica virale tessuto associata raggiunge determinati valori (Costa et al., 1997).

Una volta in circolo IL-6 e $TNF\alpha$ possono indurre una risposta febbrile attraverso l'attivazione della catena dell'acido arachidonico e con conseguente aumento delle prostaglandine E2 (PGE2). La fase cronica della malattia evolve nella maggior parte dei soggetti in una forma inapparente o asintomatica. I sintomi scompaiono in genere entro un anno e il soggetto rimane portatore asintomatico dell'infezione per tutta la vita; la fase asintomatica dell'infezione è caratterizzata da una limitata replicazione

virale e l'assenza di manifestazioni cliniche è correlabile all'efficace attività immunitaria dell'ospite.

Il ruolo dei soggetti asintomatici, siccome rappresentano la maggioranza, andrebbe inoltre ulteriormente indagato, poiché in questi casi il virus nel sangue è in quantità talmente bassa che in natura gli insetti ematofagi, in particolare i tafani, con difficoltà riescono ad assumerlo e inocularlo in un altro animale. A tal riguardo bisogna sempre tener presente che eventi stressanti (superlavoro, malattie intercorrenti, trattamenti cortisonici) possono riattivare l'infezione in qualsiasi momento.

Il virus appartiene alla famiglia *Retroviridae*, genere *Lentivirus* ed ha come bersaglio principale le cellule della linea monocito-macrofagica (Oaks J.L. e al., 1998) le quali, essendo per lo più circolanti, distribuiscono il virus a tutti i distretti dell'organismo. I monociti sono permissivi all'ingresso del virus, ma è la differenziazione in macrofagi (Sellon D.C. e al., 1994) che ne consente la replicazione. In queste cellule il virus dell'AIE integra il proprio genoma garantendo la sua persistenza. In un recente studio la replicazione virale è stata dimostrata anche nelle cellule endoteliali dei vasi renali di un portatore silente (Leroux e al., 2004).

Lesioni caratteristiche della forma acuta e subacuta sono le emorragie su sierose e mucose, edemi, congestione splenica, splenomegalia, epatomegalia, steatosi, sangue rosa chiaro (anemia) e poco coagulabile (trombocitopenia). Nella forma cronica prevalgono invece i fenomeni iperplastici a carico di fegato, milza e linfonodi. In particolare la splenomegalie e l'epatomegalia sono esacerbate dalla trombocitopenia (Clabough e al., 1991). In aggiunta il legame della frazione C3 del complemento con gli eritrociti che si deposita anche a livello dei glomeruli renali, contribuisce non solo all'anemia emolitica ma provoca la presenza di granuli di emosiderina nei macrofagi del fegato, milza e linfonodi (Sentsui e Kono, 1987). Come per le altre infezioni

lentivirali si sviluppa sia una risposta cellulo-mediata che interviene nel controllo della fase acuta dell'infezione, sia una risposta umorale, che persiste per tutta la vita. A tal riguardo bisogna sottolineare che l'assenza di malattia negli equidi è correlata con una bassa carica virale tessuto associata (Harrold e al., 2000) ed è dipendente dalla presenza di linfociti T e B funzionali in associazione ad una risposta immunitaria adattativa. Quanto sopra trova riscontro dal momento che è stato osservato che puledri con disturbi congeniti della funzionalità dei linfociti T e B non sono in grado di controllare la viremia da infezione di AIE, ma a seguito di trasfusioni da donatori infetti i puledri riprendono il controllo della replicazione virale (Mealey e al., 2001; Perryman e al., 1988; Taylor e al., 2010), inoltre trattamenti immunosoppressori in cavalli asintomatici inducono recrudescenza della malattia con aumento della replicazione virale (Craig e al., 2007a; Kono e al., 1976; Tumas e al., 1994).

Negli equidi infetti la risposta anticorpale è particolarmente abbondante ed è diretta soprattutto verso le proteine strutturali del virus quali la *p26* o proteina capsidica (proteina CA) e le glicoproteine dell'envelope gp45, proteina transmembrana (TM) e gp90, proteina di superficie (SU). A tal riguardo sebbene la proteina p26 è la proteina virale più abbondante, la risposta umorale contro la p26 è da 10-100 volte inferiore a quella nei confronti della gp45 e gp90, quest'ultimi compaiono dopo 2-3 mesi dall'infezione suggerendo che non sono responsabili del controllo degli episodi acuti della malattia (Hammond S.A. e al., 1997). Inoltre la recrudescenza della malattia è associata alla comparsa di stipiti virali antigenicamente diversi da quello di partenza che eludono gli anticorpi neutralizzanti suggerendo che tale risposta umorale è efficiente nel controllo della replicazione virale (Leroux e al., 2001). Pertanto il ruolo

degli anticorpi neutralizzanti nel controllo della replicazione virale rimane ancora non chiaro e complesso.

La diagnosi su base anatomo-clinica è praticamente impossibile per la varietà e gravità dei sintomi clinici che si possono registrare in corso di infezione (Leroux e al., 2004)

La diagnosi dell'*AIE* si basa principalmente sull'impiego di metodi sierologici (Issel e al., 1999). L'*AGID* nella sua variante (Agid Coggins e Agid qualitativa) rappresenta il metodo ufficiale, così come previsto dal D.M. del 4/12/1976 (Profilassi dell'anemia infettiva degli equini) tra le indagini sierologiche per la diagnosi di *AIE* e tra l'altro è il metodo prescritto dal manuale OIE (2013) per le movimentazioni internazionali. Tale metodica presenta un'elevata specificità e costituisce l'unica prova che è stata correlata con la presenza del virus nel sangue, com'è stato dimostrato nelle infezioni sperimentali sull'equino (Pearson et al., 1971).

L'*ELISA* rappresenta uno strumento molto utile per la diagnosi di *AIE* da applicare soprattutto in fase di screening; l'adozione di piani di monitoraggio per l'*AIE* a livello nazionale ne favorisce l'impiego in misura sempre crescente per le caratteristiche di elevata sensibilità e rapidità di esecuzione del test, associate alla possibilità di ottenere un risultato oggettivo (Issel e al., 2012).

Il limite del test *ELISA* è il possibile riscontro di falsi positivi, per cui la positività deve essere confermata mediante l'*AGID*.

Il Manuale dell'OIE prevede l'impiego del *Western Blot* (Issel e al., 1987) come tecnica sierologica alternativa all'*AGID*, per la conferma della positività in maniera efficace nei casi di esiti discordanti tra *AGID* ed *ELISA*.

Indipendentemente dalla metodica, un importante limite delle prove sierologiche è legato all'esistenza di un periodo *finestra* di almeno due settimane dal contagio. In

questo caso il soggetto, pur avendo infezione e attiva replicazione virale in atto, non ha ancora anticorpi in circolo e con le prove sierologiche risulterà pertanto negativo. In ragione di ciò sono sempre più frequenti il ricorso e lo sviluppo di sistemi di diagnosi diretta per accertamenti di tipo virologico. In quest'ambito, le tecniche molecolari altamente sensibili e specifiche hanno dato grande impulso al settore, consentendo di rilevare la presenza di infezioni virali che altrimenti sfuggirebbero con le prove convenzionali (Capomaccio et al., 2012; Cappelli et al., 2011; Cook e al., 2002; Dong et al., 2012b; Langemeier e al., 1996; Nagarajan and Simard, 2001; Quinlivan e al., 2007).

La diagnosi virologica è al tempo stesso problematica (Hines and Maury, 2001), perché in vitro l'isolamento virale è tecnicamente complicato.

Altrettanto oscuro è l'utilizzo dei test di diagnostica molecolare sia per la variabilità genetica del virus che può essere di tipo geografico che individuale dal momento che nell'animale infetto alcune regioni del virus subiscono una notevole variazione nel corso del tempo e sia come notevole variabilità nella carica viremica RNA/DNA provirale durante l'infezione (Leroux et al. 2004). Pertanto per un buon successo dei saggi basati sull'utilizzo della PCR è necessario identificare regioni molto conservate del genoma virale, un processo non agevole dal momento che le sequenze virali pubblicate sono molto ridotte e perlopiù di regioni diverse del gene *gag*. Non bisogna sorprendersi se alcuni saggi di PCR sono specifici del ceppo virale per le quali sono stati disegnati (Cook e al., 2002). Un altro problema nello sviluppo dei saggi di diagnostica molecolare per AIE e che devono possedere un'adeguata sensibilità perché a seguito dell'esposizione iniziale al virus e con la fine dei segni clinici, la viremia e la carica virale tessuto associata si porta a livelli molto bassi (Cook et al., 2003; Harrold et al., 2000). Così come molto bassa è la carica viremica nei portatori

asintomatici, la fase in cui la maggior parte dei equidi infetti vengono identificati. Pertanto, la sensibilità diventa particolarmente importante se il saggio diagnostico deve essere impiegato come test di screening.

Nonostante queste considerazioni, un discreto numero di saggi di PCR sono stati descritti per rilevare gli acidi nucleici virali in matrici di animali naturalmente infetti (Capomaccio et al., 2012; Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012b; Nagarajan and Simard, 2001; Quinlivan et al., 2007) e alcuni di questi saggi sono stati impiegati per rilevare l'infezione in equidi nella fase di portatore inapparente.

Il saggio di PCR descritto da Nagarajan e Simard (2001) si è rivelato molto utile nel rilevare il DNA provirale nelle cellule mononucleate del sangue periferico di equidi sieropositivi in Canada. E sebbene i primers impiegati in questo saggio siano attualmente raccomandati dall'OIE per rilevare il virus dell'AIE, lo stesso saggio non è altrettanto valido per rilevare il DNA provirale in equidi positivi in Europa (Cappelli e al., 2011) e in Giappone (Dong et al., 2012b) molto probabilmente per una significativa variazione nella sequenza target dei primers. Successivamente sono stati sviluppati altri saggi di PCR e sono stati riportati come essere molto utili nel rilevare gli acidi nucleici virali in equidi sieropositivi in situazioni in cui la sequenza genomica del virus è sconosciuta (Capomaccio et al., 2012; Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012b; Quinlivan et al., 2007). Inoltre molti di questi saggi di PCR hanno mostrato una buona correlazione con i test sierologici convenzionali anche con campioni raccolti da equidi portatori inapparenti (Cappelli et al., 2011; Dong et al., 2012b). Bisogna dire che questa correlazione è stata osservata solo per la messa in evidenza del DNA provirale e non per RNA virale plasma associato (Cappelli et al., 2011). La spiegazione di questo è che la quantità di DNA provirale nei monociti circolanti è molto più alta della carica ematica di RNA virale in equidi con infezione

inapparente. Sebbene gli autori di tali PCR sostengono di averle messe a punto a partire dalle sequenze depositate in banche dati, bisognerebbe condurre degli studi in tutto il mondo per stabilire se questi recenti saggi di PCR siano in grado di rilevare tutti o la maggior parte dei ceppi circolanti del virus dell'AIE. Ovviamente bisogna ribadire al riguardo che le sequenze disponibili in banca dati relativamente al virus AIE sono ancora troppe poche. Per quanto sopra esposto i casi sospetti e i programmi di sorveglianza per il controllo dell'AIE si basano ancora sui test sierologici (Issel et al.,1999) impiegando metodi raccomandati dal manuale OIE (2012 a,b).

Situazione epidemiologica Nazionale*

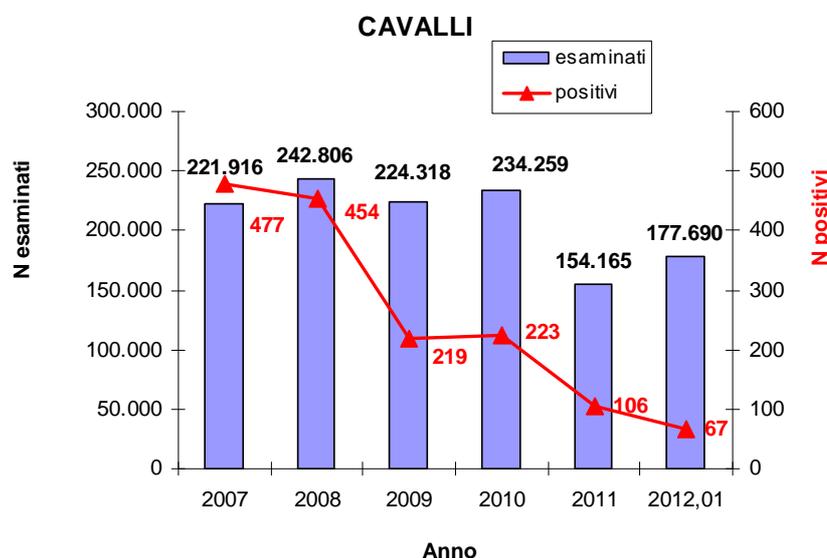
A partire dal 1994, con il mercato unico comunitario, decade l'obbligo di controllo degli equidi per Anemia, pertanto per più di due decenni la situazione epidemiologica nazionale è rimasta sconosciuta. Successivamente, come già descritto, a seguito di numerosi casi clinici e positività sierologiche registrati nell'estate 2006, il Ministero della Salute ha reso obbligatorio, il controllo sierologico di tutta la popolazione equina nazionale. A seguito di queste disposizioni reiterate fino al 2012 si è passati dal controllo di circa 40.000 equini nel periodo 2000-2005 ai 233.064 soggetti controllati nel 2007, 258.270 nel 2008, 237.279 nel 2009, 235.000 circa nel 2010, 167871 e 196266 nel 2012.

Tale attività ha rilevato una prevalenza grezza della malattia nei cavalli con valori di inferiori allo 0,5% in 17 regioni. Complessivamente nel periodo 2007-2012 la prevalenza nazionale dei cavalli è passata da 0,21% (IC95% 0,19-0,23) nel 2007 a 0,07% (IC95% 0,04-0,13) nel 2011 per arrivare a 0,04% (IC95% 0,01-0,08) nel 2012. Mentre le prevalenze grezze mostravano valori inferiori allo 0,5%, le Regioni Molise e Abruzzo hanno evidenziato percentuali di equidi positivi assai superiori. Nel 2007 le percentuali di positività per le due Regioni erano rispettivamente pari all'1% e 3,7%. In particolare la popolazione equina Abruzzese ha contribuito in modo sostanziale al dato di prevalenza complessivo. Infatti tale Regione nel quinquennio di sorveglianza ha registrato mediamente il 40% del totale di equidi positivi per anno, pur contribuendo al campione nazionale degli equidi esaminati nei singoli anni appena sopra il 4%. Infine non sono risultati trascurabili i dati di positività registrati nelle Regioni Lazio e Toscana che hanno rappresentato rispettivamente circa il 20% e il 10% del totale nazionale di equidi positivi.

*fonte dati CRAIE

Nel grafico 1 si riporta la distribuzione dei campioni analizzati con il numero degli cavalli positivi nel quinquennio del Piano Nazionale di sorveglianza della malattia.

Grafico 1: specie cavallo - campioni ematici analizzati e positivi nel periodo 2007-2012



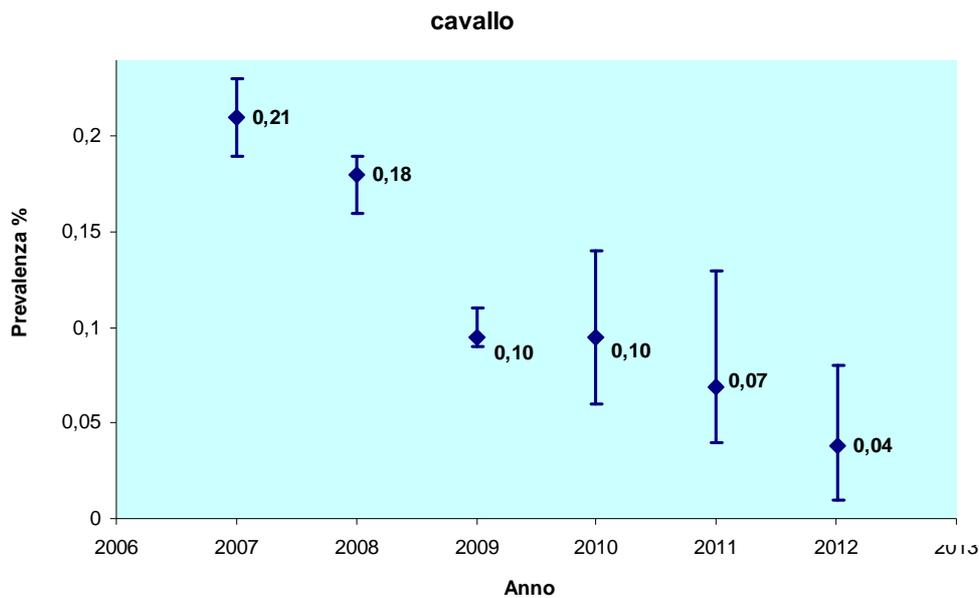
Nel grafico 1 si osserva una riduzione del numero di equidi sottoposti a controllo, nel 2011 rispetto agli anni precedenti con una stabilizzazione del dato nel 2012. La riduzione è determinata dal diradamento delle attività di sorveglianza disposto dal Ministero della Salute nelle Regioni con bassa incidenza a partire dall'anno 2010.

La rimodulazione basata sull'analisi della situazione epidemiologica, emersa dopo il primo biennio, ha previsto una riduzione dei controlli con cadenza bi-annuale su tutti gli equidi stanziali di età superiore a 6 mesi, ad eccezione delle regioni Abruzzo, Lazio, Molise e Umbria, dove la periodicità dei controlli è rimasta annuale. Inoltre la periodicità dei controlli è stata annuale anche per tutte quelle aziende, che indipendentemente dalla Regioni, allevavano muli, questo in funzione del fatto che il rischio maggiore d'infezione riguarda le tipologie di allevamento con coesistenza di muli.

Nel grafico 2 viene illustrato l'andamento della prevalenza di campioni positivi, con una tendenza alla progressiva e significativa diminuzione. Nel grafico si rileva che il

reale abbattimento delle prevalenza per AIE nei cavalli si riferisce all'anno 2009 rispetto al biennio precedente. Nel successivo triennio la sieroprevalenza rimane sostanzialmente costante e risulta comunque tale da rappresentare, nel dato cumulato nazionale, uno stato di apparente infezione sporadica.

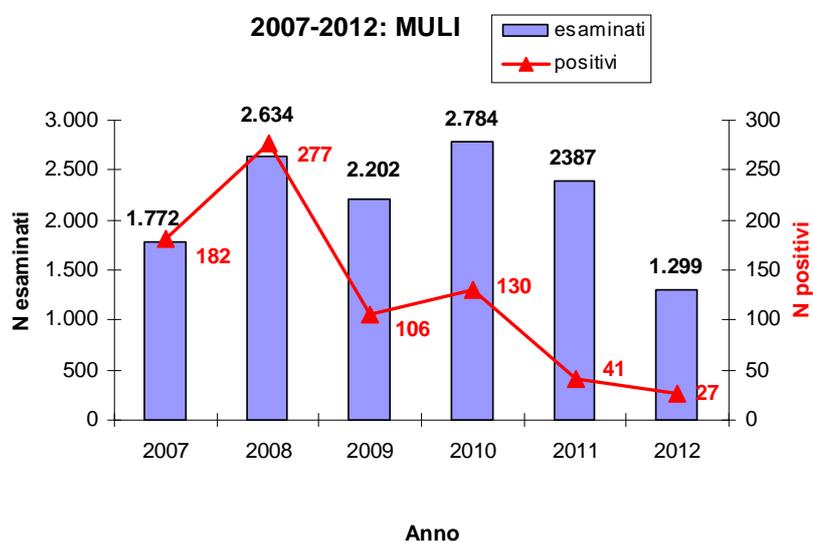
Grafico 2: specie cavallo - prevalenza annuale di campioni ematici positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2007-2012



Per quanto riguarda la diffusione dell'AIE nel mulo è stato osservato che la prevalenza nazionale di soggetti positivi per AIE è risultata intorno al 10% nel biennio 2007-08. I capi positivi si riscontrano nelle Regioni Abruzzo (37,02%), Lazio (17,33%), Marche (12,19%) e Toscana (7,73%), per una quota complessiva superiore al 74% del totale. Risulta evidente come il Mulo sia specie nella quale si osserva un sostanziale annidamento dell'infezione virale, soprattutto considerando l'elevato numero di soggetti risultati positivi in confronto all'esiguità della popolazione esaminata. Per esempio, nel 2007, i muli positivi (N=182) rappresentavano oltre il 27% degli equidi complessivamente risultati positivi nel 2007 (N=663), sebbene costituivano solo lo 0,76% (N=1772) del campione nazionale degli equidi esaminati (N=233064). Il Mulo va quindi considerato a rischio molto elevato per AIE su tutto il

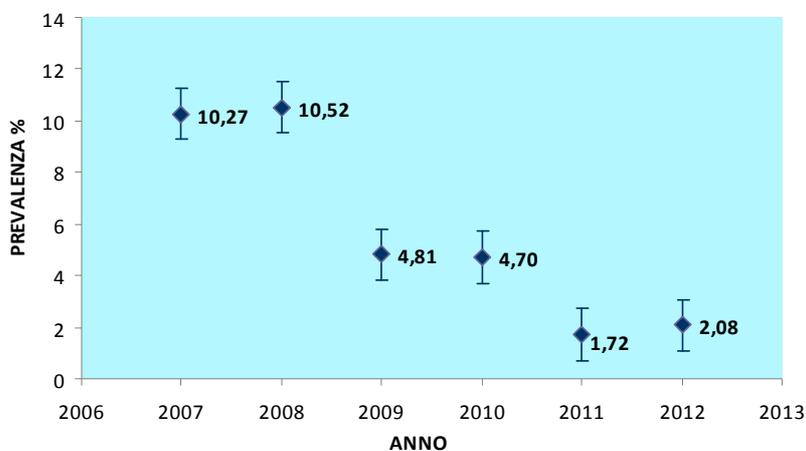
territorio nazionale. Nonostante la natura provvisoria di alcuni dati di prevalenza regionale, dovuta al non completo screening della popolazione in alcune regioni, tale suddivisione può fornire alcune indicazioni operative circa la gestione futura della sorveglianza. Nel grafico 3 si riporta il numero complessivo nazionale di campioni ematici di mulo analizzati e quelli confermati positivi nel periodo **2007-2012**

Grafico 3: specie mulo - campioni ematici analizzati e positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2007-2012



Nel grafico 4 si riporta l'andamento delle prevalenze di campioni positivi.

Grafico 4: specie mulo - prevalenza annuale di campioni ematici positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2007-2012



Dal grafico 4 si osserva come la prevalenza di campioni positivi si attesta intorno al 10% nel biennio 2007-2008 per passare a valori prossimi al 5% nel biennio 2009-2010 e attestandosi a valori del 2,08% nel 2012. Pertanto nell'ibrido mulo è stata osservata una progressiva e sostanziale diminuzione della prevalenza con due punti di flessione significativi:

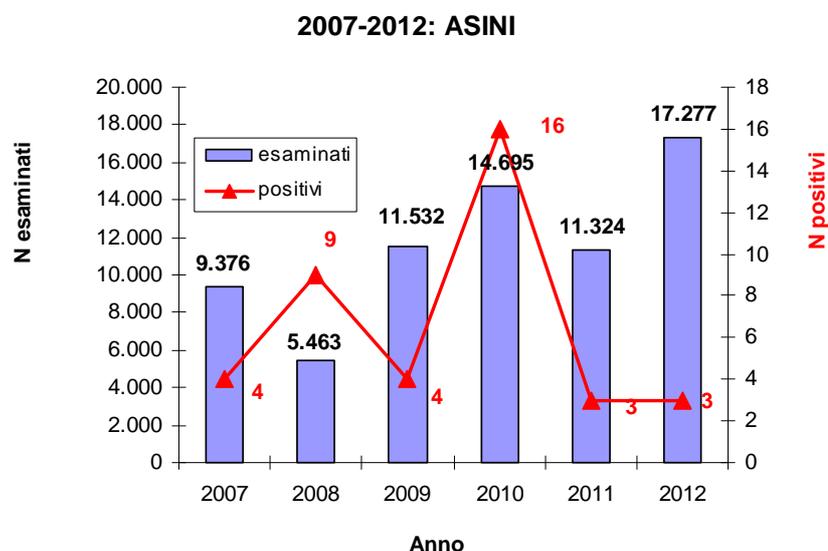
- tra 2008 e 2009 (Chi Square Yates corrected; 52,7; $p < 0,00000$)
- tra 2010 e 2011 (Chi Square Yates corrected; 31,8; $p < 0,00000$)

Inoltre la distribuzione annuale delle prevalenze di campioni positivi di muli per AIE in base alla regione di provenienza conferma quanto osservato nella specie cavallo circa l'evidente concentrazione delle positività nelle regioni dell'Italia Centrale.

Per contro la specie asinina si è dimostrata nel quinquennio in esame a basso rischio di AIE.

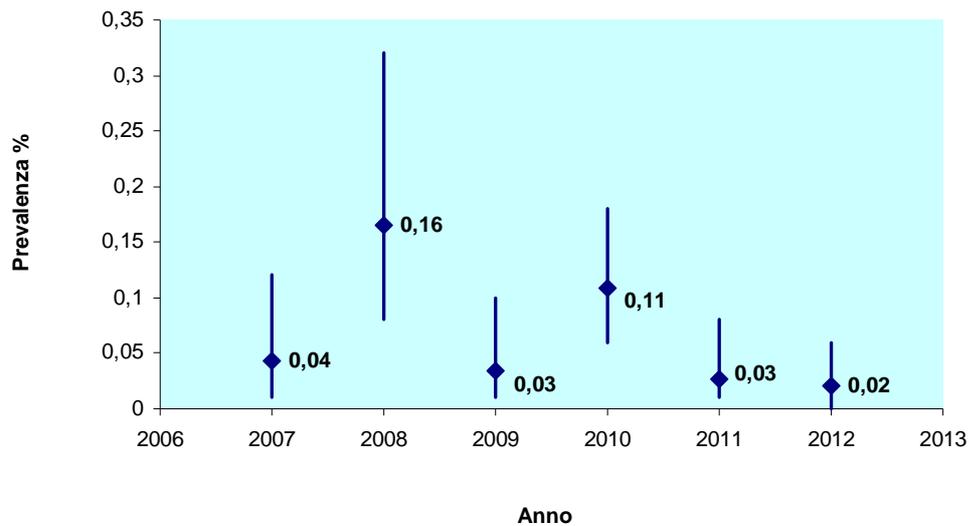
Nel grafico 5 si riporta la distribuzione dei campioni analizzati della specie asinina. Nel periodo 2011-2012 sono stati analizzati 28.601 campioni appartenenti alla specie asino, 6 dei quali confermati positivi dal CRAIE (0,02%).

Grafico 5: specie asino - campioni ematici analizzati e positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2007-2012



Nel grafico 6 si riporta l'andamento delle prevalenze di campioni positivi nel periodo 2007-2012. Complessivamente sono stati esaminati 69667 campioni ematici della specie asino con un totale di 29 soggetti positivi.

Grafico 6: specie asino - prevalenza annuale di campioni ematici positivi confermati dal CRAIE nel periodo 2007-2012



Nel grafico 5 si rileva che la numerosità di campioni analizzati su base annuale è assai variabile con un numero minimo di test eseguiti nel 2008 (N=5.463) ed un picco nel 2012 (N=17.227). Tale dato suggerisce una diversa intensità di prelievo sui capi della specie asino nel periodo ed un verosimile mancato raggiungimento del 100% dei controlli sulla popolazione reale in uno o più anni di sorveglianza. La disomogeneità dei denominatori (numero di campioni testati per anno) potrebbe aver quindi determinato distorsioni nella stima delle prevalenze annuali di campioni positivi. In base al costante scarso numero di casi individuati annualmente, viene tuttavia confermata l'incidenza sporadica dell'infezione nella specie asino.

Complessivamente possiamo affermare che i trend osservati nella popolazione di capi e aziende controllati nel biennio 2011-2012 hanno evidenziato un progressivo e costante abbattimento dei livelli di occorrenza di AIE sul territorio nazionale, nonostante la conferma di cluster di infezione del centro-sud Italia (mappe 1A, B, C e D). Tale quadro risulterebbe congruo rispetto all'efficacia delle misure di controllo messe in atto, con conseguente progressiva riduzione delle fonti di infezione rappresentate dagli animali infetti. Considerando inoltre come la malattia sia connessa a meccanismi di trasmissione in natura poco efficienti (insetti vettori meccanici), la riduzione delle fonti di contagio prefigura ripercussioni favorevoli sul futuro quadro epidemiologico dell'AIE. Tenuto conto che la popolazione generale di equidi è stata sottoposta a controllo solo a partire dal 2007, il dato di prevalenza delle prime 2 annualità (2007-2008) risultava verosimilmente costituito in maggioranza da campioni positivi "prevalenti", ossia da campioni di equidi mai testati prima, i quali avevano contratto l'infezione negli anni antecedenti il 2007. Le stime di prevalenza di campioni positivi del secondo biennio (2009-2010) venivano quindi interpretate come migliore espressione dell'incidenza dell'infezione, spiegata da 2 possibili motivazioni:

- il riscontro di campioni di equidi testati e negativi in precedenza i quali avevano contratto infezione a partire dal 2008;
- il riscontro di nuovi casi su capi di nuovo arruolamento e non testati nel corso degli anni precedenti.

Nelle mappe che seguono si riporta la distribuzione geografica delle aziende con almeno un equide confermato positivo nel corso dell'ultimo biennio del piano di sorveglianza nazionale.

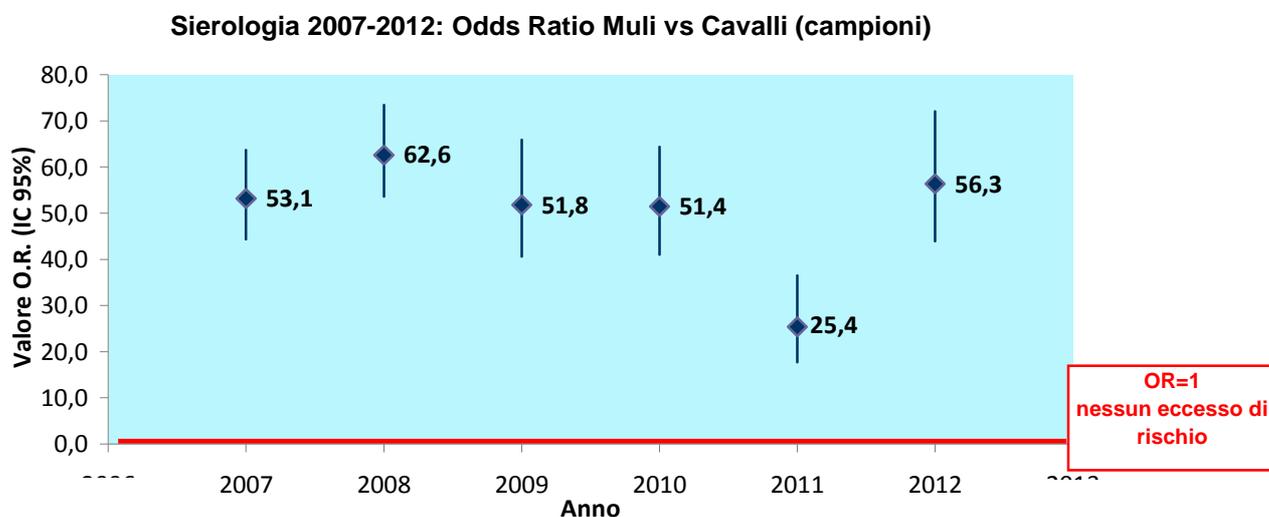
Confronto del rischio per Anemia Infettiva Equina tra cavalli e muli

Nel corso del periodo 2007-2012 la prevalenza cumulativa di campioni positivi per i muli è risultata decisamente più elevata rispetto ai campioni esaminati della specie cavallo. Utilizzando i dati relativi ai controlli svolti nel periodo 2007-2012, è stato stimato il rischio per AIE in funzione della specie di appartenenza dei campioni. Sulla base delle prevalenze di campioni positivi per AIE osservate nelle 2 specie, è stata “misurata” l’eccedenza di rischio di risultare positivi per AIE dei muli rispetto ai cavalli. Tale verifica è stata effettuata per ogni annualità mediante calcolo dell’Odds Ratio – O.R. ponendo come riferimento i dati (N° positivi e N° analizzati) relativi ai cavalli rispetto ai muli. In tabella 1 si riporta la sintesi dei campioni negativi e positivi confermati dal CRAIE per i muli ed i cavalli e calcolo di O.R. (stima del rischio per i muli rispetto ai cavalli). Nel grafico 7 sono riportate le OR calcolate per ogni anno di riferimento.

Tabella 1: campioni ematici negativi, positivi confermati dal CRAIE e prevalenza in base a specie nel periodo 2007-2012 – OR (IC95%) mulo rispetto a cavallo per ogni annualità 2007-2012

		campioni		prevalenza %	O.R.	IC 95%	
		positivi	negativi			limite inf.	limite sup.
2007	<i>cavallo</i>	477	221.439	0,21	<i>baseline</i>		
	<i>mulo</i>	182	1.590	10,27	53,14*	44,31	63,71
2008	<i>cavallo</i>	454	242.352	0,18	<i>baseline</i>		
	<i>mulo</i>	277	2.357	10,52	62,64*	53,57	73,46
2009	<i>cavallo</i>	219	224.099	0,10	<i>baseline</i>		
	<i>mulo</i>	106	2.096	7,38	51,75*	40,59	65,94
2010	<i>cavallo</i>	223	234.036	0,10	<i>baseline</i>		
	<i>mulo</i>	130	2.654	4,81	51,41*	41,02	64,4
2011	<i>cavallo</i>	106	154.059	0,07	<i>baseline</i>		
	<i>mulo</i>	41	2.346	1,72	25,4	17,7	36,5
2012	<i>cavallo</i>	67	177.623	0,04	<i>baseline</i>		
	<i>mulo</i>	27	1.272	2,08	56,3	43,9	72,04

Grafico 7: specie mulo e cavallo – 2007-2012 stima del rischio per AIE (Odds Ratio) - mulo rispetto a cavallo



Per ogni annualità, nel periodo 2007-2012, i campioni della specie mulo hanno mostrato un rischio significativamente più elevato di risultare positivi per AIE rispetto ai campioni della specie cavallo. Nonostante le prevalenze osservate per i campioni di entrambe le specie hanno mostrato un trend significativo di riduzione nel corso del quinquennio, il notevole eccesso di rischio per AIE nei muli si è mantenuto nell'intero periodo di osservazione.

Mappa 1A

*Anemia Infettiva degli Equidi
Aziende con almeno un equide
positivo confermato in Italia
nel periodo 01-01-2011 - 31-12-2011*

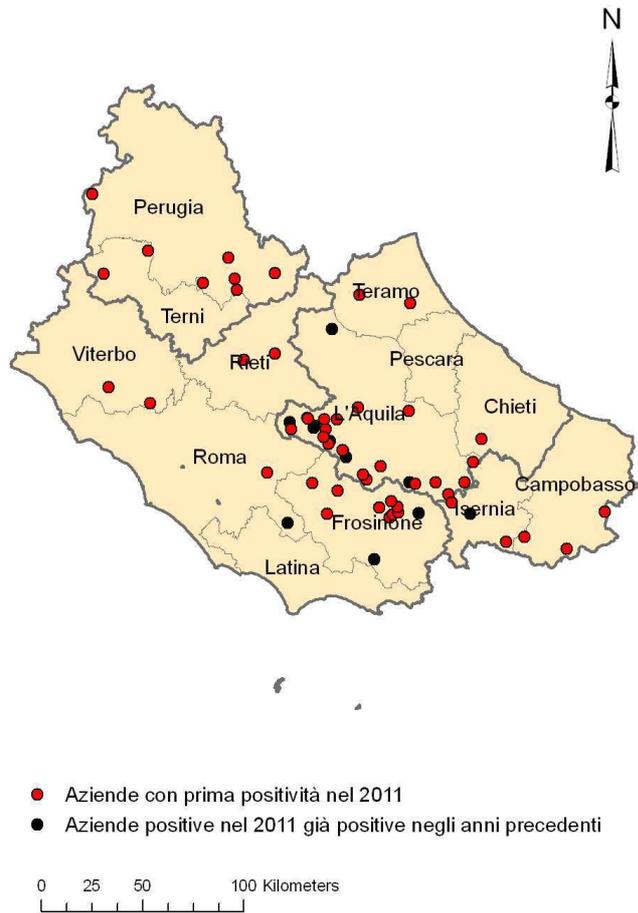


- Aziende con prima positività nel 2011
- Aziende positive nel 2011 già positive negli anni precedenti

0 65 130 260 Kilometers

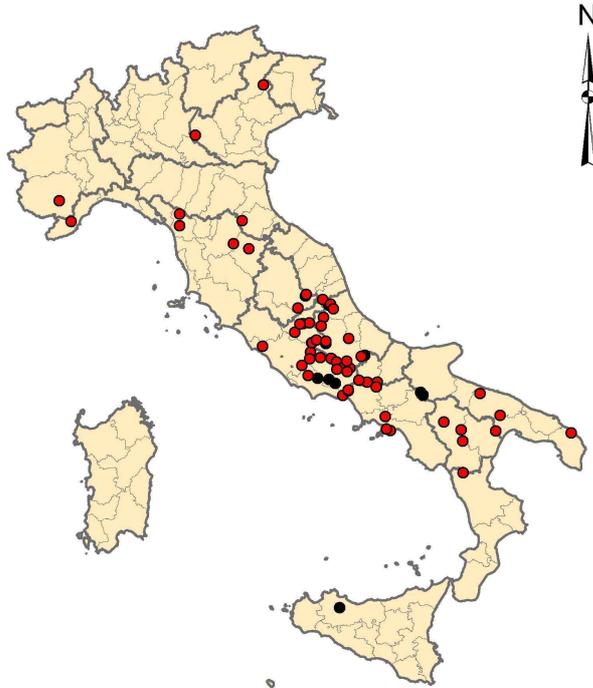
Mppa 1B

***Anemia Infettiva degli Equidi
Aziende con almeno un equide
positivo confermato in Italia centrale
nel periodo 01-01-2011 - 31-12-2011***



Mappa 1C

***Anemia Infettiva degli Equidi
Aziende con almeno un equide
positivo confermato in Italia
nel periodo 01-01-2012 - 31-12-2012***

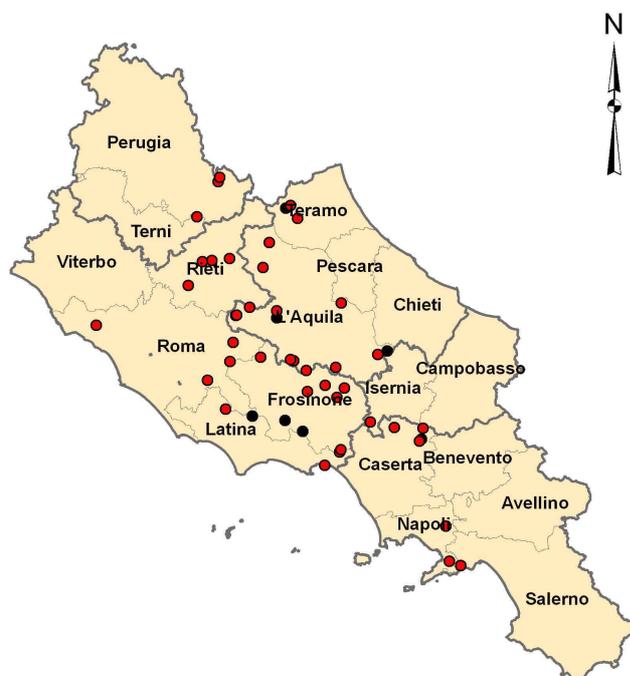


- Aziende con prima positività nel 2012
- Aziende positive nel 2012 già positive negli anni precedenti

0 75 150 300 Kilometri

Mappa 1D

***Anemia Infettiva degli Equidi
Aziende con almeno un equide
positivo confermato in Italia centrale
nel periodo 01-01-2012 - 31-12-2012***



Come si evince dalle mappe esposte la prevalenza della malattia risulta particolarmente alta nell'Italia Centrale, nelle Regioni Abruzzo, Molise, Umbria e Lazio. Pertanto il prossimo programma di Sorveglianza, partendo dalla situazione epidemiologica emersa nel periodo 2007-2012 potrà essere mirato: per specie a maggior rischio, per zone a maggior prevalenza, e per quelle regioni in cui la percentuale delle strutture che detengono equidi controllate è risulta assai inferiore alle strutture presenti.

SEZIONE SPERIMENTALE

Premessa

L'attività sperimentale della presente tesi è stata svolta dal sottoscritto presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – Centro di Referenza per l'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) – partecipando al progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute dal titolo “Anemia infettiva degli equini: valutazione di un nuovo protocollo di screening nell'attuazione del Piano di sorveglianza nazionale e verifica della concordanza fra metodiche disponibili; studio dei principali fattori di rischio nei cluster geografici di infezione; valutazioni cliniche, immunologiche e virologiche in equidi naturalmente infetti”.

In seguito ai casi clinici e positività sierologiche per AIE, riscontrati nella primavera del 2006, su soggetti sottoposti a inoculazioni di plasma infetto, non essendo stato possibile in prima istanza risalire al numero di lotti infetti e alla loro distribuzione sul territorio Nazionale, a partire dal 2007, il Ministero della Salute aveva emanato un Piano di Sorveglianza, rendendo obbligatorio l'esecuzione dei controlli sierologici annuali per l'AIE su tutti gli equidi di età superiore a sei mesi. Questa intensa attività di sorveglianza aveva portato ad evidenziare cluster di infezione in alcune regioni dell'Italia centrale interessando soprattutto i muli.

A questo punto bisognava capire se i tassi di prevalenza osservati fossero riconducibili ad una effettiva maggiore sensibilità di questo ibrido nei confronti dell'infezione oppure ad un differente grado di esposizione ai fattori di rischio. Al tempo stesso risultava che il quadro epidemiologico dell'AIE nel mulo era pressoché ignoto sia perché un vero e proprio controllo dell'infezione nella popolazione di muli nazionale non era mai stato condotto su base sistematica e sia perché le

disposizioni vigenti relative all'AIE erano state indirizzate alla verifica dello stato sanitario di animali da movimentare. Tale situazione potrebbe aver determinato una "libera" e progressiva circolazione del virus nel mulo.

Infine la letteratura scientifica relativamente all'AIE nell'ibrido mulo relativamente ai quadri clinici, immunologici e virologici dell'infezione è risultata molto carente. Ad oggi risulta descritto solo uno studio sull'infezione sperimentale condotta tra l'altro su un numero estremamente limitato di soggetti e per un periodo di follow-up insufficiente a chiarire gli aspetti patogenetici di un'infezione da retrovirus, per contro molto più esaustiva risulta quella relativa alla specie equina ed asinina.

Per aumentare l'efficienza del piano di sorveglianza, l'Istituto Zooprofilattico delle Regioni Lazio e Toscana (IZSLT) per gli esami sierologici di routine dell'AIE, e il CRAIE per i campioni inviati per la conferma diagnostica della Malattia aveva adottato un sistema diagnostico a tre livelli simile a quello descritto da Issel e al. (1999). Tale sistema aveva portato ad individuare 44 sieri come ELISA/IB positivi AGID negativi tra i 74880 campioni esaminati nel biennio 2009- 2010.

Dal momento che l'analisi di questi campioni aveva dimostrato che la frequenza di esiti ELISA/IB positivi AGID negativi era significativamente più alta nei muli che nei cavalli. (Odds ratio = 103 95% IC 76.22–139.2) e considerato che questa evenienza avrebbe potuto rendere la diagnosi sierologica di AIE più problematica nel mulo (*E. caballus* x *E. asinus*) e data la scarsità di informazioni relative all'AIE nei muli, abbiamo sentito l'esigenza di condurre lo studio osservazionale oggetto della presente tesi.

Obiettivo del presente lavoro:

- condurre uno studio osservazionale longitudinale su un gruppo di 10 muli naturalmente infetti;
- verificare correlazione tra la viremia plasma associata e la reattività sierologica;
- verificare se pattern di positività molto deboli al test AGID fossero associati all'elusione del controllo del virus dell'AIE associati ad un ridotto rischio di trasmissione.

Materiali e Metodi

Animali utilizzati nel progetto

Lo studio è stato condotto su 10 muli identificati da 1 a 10. Gli animali sono stati acquistati da 5 differenti focolai registrati in 5 diverse ed adiacenti province dell'Italia Centrale. Sebbene gli animali provenissero da focolai indipendenti, la localizzazione geografica degli stessi era in un'area relativamente ristretta, rappresentata dall'area dorsale dei pre-Appennini dell'Italia Centrale come riportato nella mappa 2.

Mappa 2: Province di provenienza degli animali arruolati per lo studio.



L'età degli animali variava in un ampio intervallo, con il mulo n. 2 di 2 anni, i muli n.1,5,6,7,9 e 10 con un'età tra 8 e 13 anni, il n.8 di 17 anni e i muli n.4 e 3 di 22 e 30 anni rispettivamente. Gli animali sottoposti ad osservazione erano suddivisibili in due gruppi di cinque animali ciascuno. Il gruppo P composto da cinque soggetti con una chiara reattività sierologica positiva a tutti e tre i test impiegati nel sistema diagnostico a tre livelli e il gruppo N composto da cinque soggetti negativi o con una

reattività dubbia al test AGID definita anche in modo più oggettivo come score ≤ 1 , come riportato nello schema di classificazione dello score in Figura 1A.

I pozzetti riportati nella figura 1A sono i pozzetti nei quali è distribuito il campione. In pratica il siero in esame è disposto tra due pozzetti contenenti il siero positivo di lavoro. Il pozzetto contenente l'antigene è disposto al centro, all'opposto del pozzetto contenente il campione, come riportato nella figura 1B (rappresentazione schematica della distribuzione dei campioni in esame con metodo AGID).

Le figure di positività presentate nella figura 1A rappresentano il grado di positività al test AGID e sono classificate da 5 a 1. Il simbolo "Neg" viene anche espresso come "0" mentre con lo score 1 corrisponde alle reazioni con positività molto deboli. Le reazioni riportate nella figura 1 con i numeri da "1" e "5" corrispondono a reazioni da considerare positive al test AGID.

Figura 1A: Schema di score per la classificazione delle reazioni nel test AGID.

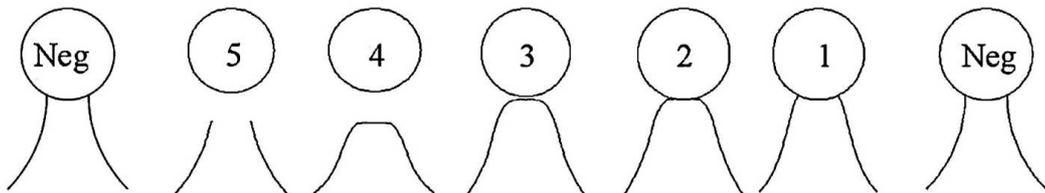
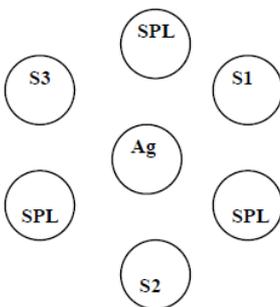


Figura 1B: rappresentazione schematica della distribuzione dei campioni in esame con metodo AGID.



Il gruppo P comprendeva i muli numerati con 1,2,4,9 e 10 e il gruppo N i muli 3,5,6,7 e 8. Nella tabella 2 si riporta il riepilogo delle caratteristiche generali del gruppo di animali osservati e il profilo di reattività sierologica all'AIE.

Tabella 2. Caratteristiche relative ad età, sesso e reattività sierologica e durata del trattamento immunosoppressore del gruppo di muli utilizzati nel lavoro.

Numero identificativo del mulo	età	sesso	reattività sierologica (ELISA/AGID/IB ^a)	Durata del trattamento Immunosoppressore in giorni
1	12	femmina	+/2/+	8
2	2	femmina	+/3/+	10
3	30	femmina	+/0/+	10
4	22	femmina	+/3/+	10
5	9	femmina	+/1/+	10
6	8	femmina	±/0/+	10
7	11	maschio castrato	+/1/+	10
8	17	femmina	+/1/+	10
9	11	femmina	+/2/+	10
10	7	femmina	+/3/+	10

^aRisultati sierologici in ELISA e IB riportati qualitativamente come positivo (+) o negativo (-). La reattività in AGID è riportata come score punteggio da 1 a 5 come descritto nella figura 1A. I muli con score 0 o 1 sono rispettivamente mulo 3 e 6 e mulo 5, 7 e 8.

Tutti i muli risultavano positivi in ELISA e IB ad eccezione del mulo n° 6 che reagiva negativamente al test ELISA ed AGID. Dopo un iniziale periodo di osservazione di 56 giorni, gli animali sono stati sottoposti ad immunosoppressione (IS) con desametasone, per un periodo di 10 giorni, per verificare se la risposta clinica, umorale e virologica fosse simile a quella precedentemente riportata nei cavalli (Kono et al., 1976; Craigo et al., 2007).

Prima di procedere allo studio gli animali sono stati testati per le malattie infettive di maggior rilevanza nella specie equina quali Equine Herpes Virus 1 e 4 (EHV 1 e 4) e piroplasmosi al fine di verificare se la loro presenza potesse influenzare l'evoluzione dello studio osservazionale.

Al reclutamento, definito come il giorno in cui gli animali sono stati arruolati dall'azienda di origine, tutti i soggetti erano positivi a Babesia cavalli o Theileria equi oppure ad entrambi gli emoparassiti nei test ELISAs commerciali (Babesia

equi/caballi Antibody test Kit, cELISA–VMRD, Inc.[®]) effettuati in accordo alle istruzioni riportate dal produttore. Per questo motivo, tutti i soggetti sono stati sottoposti una settimana prima che iniziasse lo studio osservazionale ad un trattamento con Imidocarb (Intervet[®]) con il dosaggio indicato dal produttore. Durante tutta la fase sperimentale gli animali sono stati esaminati con cadenza settimanale per le infezioni sostenuta da EHV-1 e 4 usando un saggio di Real-time PCR (RT-PCR) così come descritto da Damiani e al. (2005).

A partire dal giorno del reclutamento gli animali sono stati stabulati in una struttura coperta.

Le procedure relative al governo degli animali e alla sperimentazione sono state condotte sotto supervisione veterinaria e in accordo con la normativa comunitaria vigente sugli animali da sperimentazione.

Per tutta la durata dello studio sono state adottate misure di biosicurezza per azzerare il rischio di trasmissione della malattia, specialmente rappresentato da quello iatrogeno. Inoltre sebbene lo studio sia stato effettuato in un periodo non coincidente con quello di attività degli insetti vettori, i muli sono stati regolarmente trattati con insetto repellenti, Tri-Tec 1 (Farnam[®]).

Si riporta a seguire un riepilogo dello stato sanitario degli animali al giorno del reclutamento.

MULO 1: risultava positivo per entrambe le piroplasmosi, debolmente positivo per EHV-1 1 e positivo per EHV- 4, positivo per AIE anche in AGID con score 2.

MULO 2: questo mulo partiva negativo per entrambe le piroplasmosi, debolmente positivo per EHV-1 e positivo per AIE anche in AGID con score 3.

MULO 3: l'animale risultava sieropositivo per arterite virale, positivo per B. caballi, negativo per Theileria equi, debolmente positivo per gli herpes e negativo per AIE in AGID.

MULO 4: siero-negativo agli agenti infettivi presi in considerazione, positivo AIE con score AGID pari a 3.

MULO 5: tale mulo partiva positivo per entrambe le piroplasmosi, debolmente positivo per EHV-1 e 4, negativo in AGID.

MULO 6: questo mulo partiva positivo per B. equi, debolmente positivo per EHV 1 e positivo per EHV-4, negativo in AGID.

MULO 7: quest'animale partiva positivo per B. equi, debolmente positivo per EHV-1 e positivo EHV- 4, negativo in AGID.

MULO 8: soggetto positivo per entrambe le piroplasmosi al momento dell'arruolamento, positivo per EHV-1 e 4, debolmente positivo in AGID.

MULO 9: Animale positivo per entrambe le piroplasmosi, positivo per EHV-1 e 4, debolmente positivo in AGID.

MULO 10: mulo positivo per B. equi, positivo per EHV-1 e 4, positivo in AGID.

Raccolta campioni per esami di laboratorio

I muli sono stati controllati quotidianamente per un totale di 84 giorni per sintomi indicativi di AIE (Leroux et al. 2004): alterazione dello stato generale dell'animale, febbre, anemia, edema e ittero. La temperatura rettale è stato misurata giornaliermente e sempre alla stessa ora.

Campioni di sangue con e senza acido etilendiamminotetracetico (EDTA) sono stati raccolti quotidianamente dalla vena giugulare in tubi venoject[®] per le indagini sierologiche e virologiche. Da ciascun campione con anticoagulante sono stati ottenuti il plasma ed i leucociti (buffy coat) nel seguente modo: un volume di cinque

ml di sangue è stato sottoposto a centrifugazione per 5' a 500g al fine di separare il plasma dagli eritrociti. Successivamente il plasma è stato trasferito in una nuova falcon e sottoposta a centrifuga per 30' a 1200g in questo modo il plasma ottenuto, privo della frazione cellulare, è stato raccolto e stoccato. Il pellet di leucociti rimanente è stato sospeso in un volume di 0,5 ml di terreno di trasporto costituito per il 50% da PBS (phosphate buffer solution) contenente Penicillina G pari a 10.000 IU/ml, Streptomina pari a 0,01 g/ml e infine Amfotericina B 0.25 mg/ml e il 50% da glicerolo. Inoltre sempre quotidianamente, tamponi nasali sono stati raccolti da tutti i soggetti per verificare la presenza di EHV-1 e 4 ed immersi in terreno di trasporto. Dopo una notte di incubazione a 4°C i tamponi sono stati centrifugati per 20' a 1000g e il surnatante trasferito in nuove provette. Tutti i campioni sono stati stoccati a - 80°C fino al giorno dell'esame.

Il siero è stato ottenuto dai campioni di sangue previa centrifugazione per 10 minuti a 179g, il surnatante è stato raccolto e conservato a -80°C.

Inoltre campioni di tessuto (in caso di eutanasia/abbattimento del soggetto) provenienti dai seguenti organi: Milza; linfonodi mediastinici e mesenterici; Timo; Fegato; Polmone; Rene; Cervello; Midollo spinale; Cuore; Ghiandole surrenali sono stati raccolti e stoccati a -80°C per essere sottoposti a prove d'isolamento del virus e di biologia molecolare.

I campioni prelevati destinati all'esame istopatologico sono stati fissati in formalina con lo scopo di preservare il meglio possibile i tessuti.

Conta piastrinica

Trombocitemia: il conteggio delle piastrine è stato eseguito su campioni di sangue intero prelevati mediante provette contenenti EDTA con la stessa cadenza con la quale sono stati effettuati i rilievi termometrici. In considerazione del fatto che il

numero di piastrine per μl di sangue varia entro limiti molto ampi nelle singole specie e che le piastrine subito dopo il prelievo tendono a impilarsi e quindi la valutazione spesso potrebbe risultare sottostimata, come per la misurazione della temperatura corporea è stata costruita una baseline di riferimento prima dell'inizio del trattamento farmacologico con un valore limite inferiore fissato intorno a $1 \times 10^5/\mu\text{l}$. Per la conta delle piastrine (PLT) è stato impiegato un contatore automatico Cell-Dyn 3700 (ABBOTT).

Immunosoppressione farmacologica

La metodica di immunosoppressione utilizzata è stata quella descritta da Kono e al. (1996) e Tumas e al. (1994). La durata del trattamento per ciascuno animale è stata calcolata in base alla risposta di ipersensibilità ritardata cellulo mediata (DTH= Delayed Type Hypersensitivity).

Tutti i soggetti sono stati inoculati per via intramuscolare con Desametazone (DMZ) (Rapison[®]) al dosaggio di 0.11 mg/kg di peso corporeo/giorno a partire dal 57 giorno dell'inizio dell'esperimento.

Valutazione dell'immunosoppressione

Al fine di verificare l'efficacia del trattamento IS sono state effettuate prove di intradermoreazione utilizzando come allergo-aptene la fitoemagglutina (PHA *phytohemagglutinin*) (PHA – Sigma[®]). Le prove di intradermoreazione sono state eseguite su tutti i muli sia prima che dopo il trattamento di IS per misurare la risposta immunitaria istogena, evidenziabile clinicamente quale espressione di una reazione d'ipersensibilità di tipo ritardato come descritto da Baus e al. (1996)

Per misurare in modo specifico l'intensità della reazione DTH, provocata dalla risposta immunitaria cellulo-mediata (*Cellular Mediated Immunity-CMI*) e differenziare in tal modo reazioni DTH da quelle di flogosi locale anche

in considerazione del fatto che l'aumento dello spessore della plica cutanea può essere dovuto anche al lento riassorbimento del volume d'inoculo è stata impiegata l'intradermoreazione comparativa (*IDC*) che prevede l'inoculazione contemporanea in due zone distinte del collo di 50µg di *PHA* (*PHA – Sigma®*) in 1 ml di soluzione salina e 1ml di soluzione salina tal quale e il confronto delle relative reazioni.

La misurazione dell'incremento dello spessore della plica cutanea è stata misurata con cutimetro a distanza di 24 ore dall'inoculazione dell'antigene e la valutazione quantitativa della reazione *DTH* è data dal rapporto tra la reazione *PHA* e quella di controllo.

Un aumento di 5 mm o più dello spessore della piega cutanea nel punto d'inoculazione della *PHA* e di 2mm in quello della soluzione salina associato a segni clinici riferibili a una reazione infiammatoria locale è correlato a una buona risposta *CMI* dell'individuo prima del trattamento con desametazone. Dopo il trattamento con desametazone il rapporto tra le due reazioni deve essere ≤ 1 . L'inoculazione intradermica di *PHA*, contrariamente a prove allergiche come la reazione tubercolinica, non provoca una desensibilizzazione marcata che si manifesta con la diminuzione o addirittura la scomparsa della reattività ad una successiva inoculazione eseguita anche a distanza di diverse settimane. Ciò ha permesso di ripetere la prova a intervalli di pochi giorni l'una dall'altra in modo da monitorare la risposta *CMI* prima e dopo l'immunosoppressione. Nel caso specifico sono stati effettuati i seguenti controlli:

- La prima intradermoreazione è stata eseguita sei giorni prima dell'inizio del trattamento con desametazone;
- La seconda intradermoreazione è stata eseguita all'inizio del trattamento con desametazone;

- La terza intradermoreazione è stata eseguita al termine del trattamento con desametazone;
- La quarta e ultima intradermoreazione è stata eseguita a distanza di una settimana dal termine del trattamento con desametazone.

I muli sono stati controllati quotidianamente riguardo ad eventuali reazioni avverse legate al trattamento.

Analisi sierologica

I campioni di siero raccolti a partire dal reclutamento degli animali e durante la fase di studio sono stati esaminati sierologicamente con l'impiego del sistema diagnostico a tre livelli.

I metodi sierologici usati nello studio sono stati i seguenti: C-ELISA (ELISA), immunodiffusione in gel di agar (AGID) e immunoblot (IB). La scelta di utilizzare tali prove sierologiche è dovuta al fatto che esse sono contemplate nei piani di monitoraggio e sorveglianza nazionale.

L'antigene usato per l'ELISA e il test AGID è la *p26* ricombinante prodotta come segue: la sequenza del ceppo Wyoming del virus AIE di riferimento è stata usata per il clonaggio e l'espressione della proteina capsidica *p26* (Genbank accession number: M16575; K03334; M11337; M14855). La sequenza codificante per la proteina *p26* è stata amplificata a partire da un frammento di 1547-paia di base (bp) BamHI-XbaI, clonata nel vettore pGEM-3Zf (+/-) (Langemeier et al., 1996) gentilmente fornito dal Dr. F R. Cook (Gluck Equine Research Centre, University of Kentucky, USA). I primers per l'amplificazione della sequenza della proteina *p26* sono riportati di seguito. Questi primers sono stati modificati all'estremità 5', introducendo un sito di restrizione per il successivo clonaggio. Le sequenze di primers sottolineate corrispondono al sito di restrizione per NcoI (*p26U*) e XbaI

(p26L). I primers riportati in parentesi si riferiscono al genoma del ceppo Wyoming del virus AIE (Genbank accession number: M16575): (p26U): A TCC ATG GTA GAT GGG GCT GGA AAC AG (ceppo Wyoming position number, 838–865), (p26L): AG TCT AGA TTA AAG TGC TTT TGC CAA TAA CA, (ceppo Wyoming position number, 1553–1522).

La mix di amplificazione è stata preparata come segue: 1ng of pGEM-3Zf (+/-) 1547-bp BamHI-XbaI costruito; 40 µM each dNTP, 0.2 µM di ciascun primers p26U e p26L, 3 U di Ultra DNA pol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), DNA pol Ultra buffer 1X; 1.5 mM MgCl₂, e aggiunta di acqua (H₂O-DEPC) per raggiungere un volume totale di 100 µl. La PCR è stata effettuata utilizzando il seguente profilo termico: 80 °C for 5 min; 95 °C for 1 min; 25 cicli a: 94 °C for 30 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for 45 s; ciclo finale a 72 °C for 7 min. I prodotti della PCR sono stati digeriti con enzimi di restrizione NcoI e XbaI e successivamente clonati in un vettore di espressione pTHIO-HIS (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguendo le istruzioni del produttore. Le proteine espresse da vettore pTHIO-HIS sono state fuse all'estremità N-terminale per una versione modificata di E. coli thioredoxin (TrxA, molecular weight of 12 kDa).

Sotto il controllo di un promotore trc. Il costrutto risultante (pMTR1) è stato usato per trasformare E. coli ceppo TOP10 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Le colonie trasformate sono state fatte crescere su un terreno selettivo contenente ampicillina, seguendo procedure standard (Sambrook et al., 1989). Le colonie trasformate sono state selezionate per la presenza di pMTR1 con un'analisi con enzimi di restrizione del DNA plasmidico e purificato con kit commerciali (Plasmid-Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni del produttore.

L'identità e la sequenza dell'inserto clonato è stata controllata mediante il sequenziamento utilizzando un ABI310 - Applied Biosystems DNA sequencer. I ceppi di E. coli TOP 10 (pMTR1) clonati sono stati fatti crescere in brodo Luria contenente ampicillina e l'espressione delle proteina di fusione, clonata sotto il controllo del promotore trc è stata indotta mediante aggiunta di mM isopropyl-b-thiogalactopyranoside. Le colture cresciute in sospensione sono state centrifugate per 10 min a 2000g a 4°C e il pellet è stato risospeso in 20 mM Tris/HCl pH 8, 2,5 mM EDTA, 5 mM imidazole, come indicato dal kit di espressione (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Dopo tre passaggi di sonicazione di 20 secondi ciascuno, la sospensione è stata sottoposta a tre cicli di congelamento e scongelamento a -80°C e +37 °C. Il lisato batterico è stato successivamente centrifugato a 12.000g per 10 min a 4°C. In seguito sia il surnatante che il pellets sono stati controllati con la metodica immunoblotting per verificare la presenza della proteina ricombinante p26 usando un siero positivo di referenza internazionale acquistato dal National Veterinary Services Laboratories, USDA. La proteina rilevata nel surnatante del lisato batterico aveva il peso molecolare di circa 38 kDa così come atteso.

Come prescritto dal manuale OIE, un totale di 800 campioni (400 positivi e 400 negativi) di equidi raccolti durante le attività di screening di campo è stato utilizzato per calcolare rispettivamente sensibilità e specificità diagnostica della proteina ricombinante p26 usata nel test AGID e C-ELISA, a tal fine è stato usato come metodo di referenza il test AGID impiegando come antigene il virus dell'AIE ceppo Wyoming coltivato in colture cellulari. La specificità e la sensibilità diagnostica per il test AGID è stata del 100%, mentre per il test C-ELISA, la sensibilità è stata del 100% mentre la specificità è stata del 80.3%. In quest'ultimo caso, il fatto che la

specificità fosse più bassa non è stato considerato fattore critico dal momento che il C-ELISA è stato utilizzato come metodo di screening e pertanto tutti i campioni positivi sono stati confermati con altri test quali AGID e IB.

Di seguito si riporta una breve descrizione dei metodi utilizzati nel sistema diagnostico a tre livelli.

I sieri sono stati utilizzati con il metodo AGID descritto dal manuale OIE (OIE, 2012). I campioni sono stati testati non diluiti. La lettura delle piastre è effettuata dopo 24–48 ore d'incubazione. I risultati sono stati espressi con lo score da 0 a 5 sulla base della posizione della linea di precipitazione come riportato nella figura 1A e descritto da Issel e al., (1999).

Il metodo C-ELISA è stato utilizzato come descritto da Scicluna e al., (2008) e Issel e al., (2013) con le seguenti modifiche: ciascun siero è stato diluito per raddoppio partendo da due separate diluizioni di 1/4 e 1/6 fino alla diluizione di 1/1024 e 1/1536 al fine di ottenere diluizioni intermedie fra le due serie. Nel dettaglio la metodica C-ELISA consiste nel sensibilizzare Nunc Maxisorp[®] plates (“micropiastre di rilevamento”) per 16-24 ore a 4° C con un anticorpo monoclonale (Mab) diretto contro uno degli epitopi della p26, diluito in soluzione glicerina-PBS. Tale anticorpo svolge la funzione di “catcher”. Al termine della fase di adsorbimento del Mab catcher alla “micropiastra di rilevamento”, una “miscela p26 ricombinante-e il siero in esame” presenti nella “piastra di contatto” nella quale sono inseriti anche i controlli della reazione (controllo antigene, controllo di siero positivo, controllo di siero negativo, controllo bianco) viene trasferita alla “micropiastra di rilevamento” precedentemente adsorbito con il Mab catcher. Viene infine aggiunto il secondo Mab definito tracer, coniugato con l'enzima perossidasi (HRP). L'eventuale presenza, nel siero in esame, di anticorpi diretti contro la p26, ostacolerà l'interazione tra la p26

ricombinante con il Mab catcher. In questo caso si avrà l'inibizione dello sviluppo della colorazione, che dovrebbe seguire all'aggiunta del substrato cromogeno dell'HRP. La positività di un campione determina quindi l'inibizione dello sviluppo della colorazione. La reazione è letta allo spettrofotometro che rileva le assorbanze dei pozzetti (DO) a una lunghezza d'onda di 492 nm.

I risultati sono stati interpretati utilizzando la seguente equazione: Percentuale d'inibizione (PI) = $100 - (\text{OD media dei campioni} / \text{OD media dei controlli negativi} \times 100)$.

Il campione è considerato negativo se la PI è inferiore al 30%, positivo se la PI è maggiore del 50%, dubbio se la PI è compresa tra il 30 e il 50%. Il titolo di un siero è rappresentato dal reciproco della più alta diluizione ancora positiva.

Le membrane utilizzate nell'IB sono state fornite dal Dr. C.J. Issel (Gluck Center, KY, USA) e i dettagli della preparazione e della procedura IB utilizzata sono quelli descritti da Issel e Cook (1993) e Issel e al., (1999), con le seguenti modifiche: le membrane di partenza sono state tagliate in strisce dalla larghezza di 0,5 cm ed utilizzate per ogni singolo campione.

Il siero di ogni campione è stato testato alla diluizione di 1/20 in un volume finale di 450 µl. Siero coniugato di coniglio anti IgG di cavallo (Sigma[®]) è stato utilizzato alla diluizione d'uso in un volume finale sempre di 450 µl. I sieri sono stati considerati positivi se presentavano un'intensità di colore \geq a quella dei controlli positivi per quanto riguarda le bande corrispondente alle principali proteine del virus dell'AIE quali la p26, così come per almeno una delle due proteine dell'envolepe del virus AIE (gp90 and gp45). Gli stessi campioni sono stati esaminati ad una diluizione maggiore di 1/80, al fine di rilevare variazioni temporali della reattività per le tre

principali proteine del test IB ed eventuali differenze derivanti dall'oscuramento di tali proteine alla diluizione 1/20.

I campioni di ciascun mulo sono stati processati nei confronti dei tre metodi sierologici tutti insieme nello stesso giorno. I sieri erano esaminati tutti insieme su di un'unica piastra per quanto attiene alla *C-ELISA* e sulla stessa membrana se trattati in *IB* con l'intento di eliminare possibili variabilità derivanti dall'esame dei campioni in tempi differenti.

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 un 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 le 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'exone 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 (AppliedBiosystems, 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). Una reazione di legame è stata utilizzata per trasformare le cellule competenti ONE SHOT TOP 10 (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 lo 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 template 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 l'aggiunta di acetato di ammonio e di etanolo e la mix è stata incubata per 30 min a 20 °C. Il pellet di RNA è stato risospeso in H₂O-DEPC e conservato a -80 °C fino all'utilizzo. Prima del

congelamento il numero di molecole di RNA è stato calcolato sulla base della concentrazione del RNA misurata utilizzando lo spettrofotometro.

Il limite di rilevamento (LOD) è stato determinato utilizzando il RNA trascritto in vitro e generato con i primers del virus AIE (EIAV MkIII). Aliquote del RNA diluito in base a log₁₀ sono state preparate per coprire un range di diluizioni tra 3,77 x10⁹ fino a 1 copia/μl di RNA e conservate a -80 °C in un volume di 5 μl e usati una sola volta. Il test per il LOD è stato effettuato in tre indipendenti occasioni 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 linea 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 le copia di RNA per μl di plasma. Il valore di Ct per ciascun campione è stato calcolato sulla media ottenuta dall'esame di ciascun campione estratto ed esaminato in doppio.

Real time PCR per EHV-1 e 4

La Real time PCR per EHV-1 e 4 è stata effettuata come descritto da Damiani e al. nel 2005. Il DNA totale è stato estratto da 140 μl del surnatante del tampone nasale, utilizzando il kit QIAamp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le indicazioni del produttore ed impiegando un estrattore automatico QIAcube[®] e la sua concentrazione è stata misurata allo spettrofotometro. I primers e la sonda sono stati disegnati sulla base di una regione conservata della glicoproteina E. La sequenza e la posizione dei primers è la seguente: EHV Forward primer –

50-CCACGGCTAGGAGAGCACTT-30,

EHV Reverse primer –50-CKRGTCCAAGCTCCCAACTCT-30, EHV-1 sonda 50-FAMTCGGGCACAAAAT-MGB-30,

EHV-4 sonda 50-VIC-ATCCATCTGAGGCAACAA-MGB-3'. La posizione sul virus EHV-1 V592 (GenBank AY464052) del primers senso è da 135,198 a 135,217, per il primers antisenso è da 135,275 a 135,295 e per la sonda è stata di 229 a 135,241. La posizione sul virus EHV-4 (NS80567-Genbank AF030027) per il primer senso è da 133,697 a 133,716, per il primers antisenso la posizione è da 133,774 a 133,794 e per la sonda da 133,752 a 133,769.

Per la Real Time-PCR, TaqMan[®] Universal PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) è stata usata la seguente composizione: 12.5 µl of TaqMan1 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 900 nM del primer senso, 300 nM del primer antisenso primer, 120 nM della sonda EHV-1, 240 nM della sonda EHV-4, 5 µl del cDNA e H2O-DEPC per un volume finale di 25 µl.

L'amplificazione è stata ottenuta utilizzando un AB 7900HT Fast Real-Time PCR System with con il seguente profile termico: 50 °C per 2 min, 95 °C per 10 min, e 45 cycles di 95 °C per 15 s e 60 °C per 1 min.

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

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 piccolissime 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- CTGCCCAGGCACCACATCTA-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 cycles 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) e sono stati sequenziati

utilizzando la coppia dei primers interni della nested-PCR e 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>).

Risultati

Profilo clinico e verifica della immunosoppressione farmacologica indotta

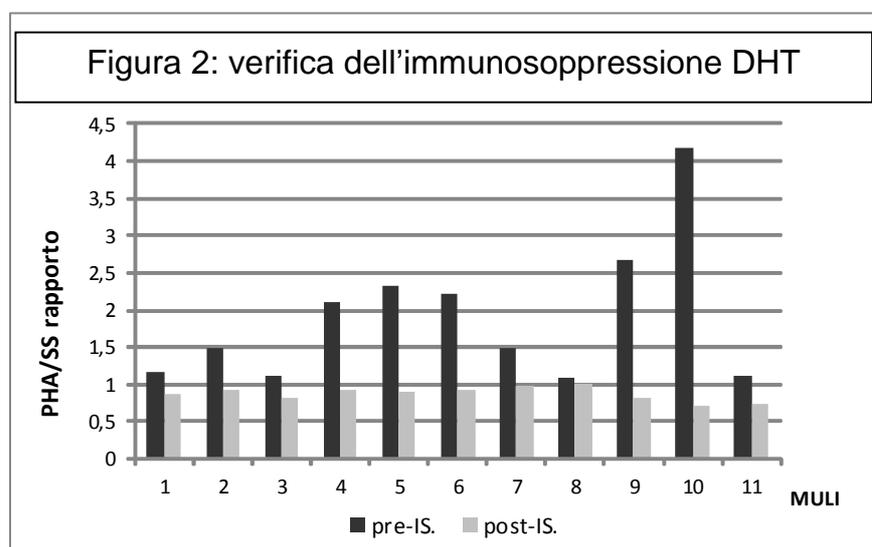
In nessun mulo oggetto del nostro studio è stata rilevata malattia al momento dell'arruolamento e nessun segno clinico comunemente associato all'Anemia Infettiva Equina è stato rilevato durante i primi 56 giorni di osservazione.

La condizione osservata appena descritta conferma la supposizione che tutti i muli erano nello stadio di portatore inapparente del virus dell'AIE e con un controllo attivo della replicazione virale. Il trattamento con Desametazone è stato effettuato in tutti i muli fino a quando il rapporto DTH tra lo spessore della plica cutanea indotta dalla PHA e il controllo era ≤ 1 . Con la sola eccezione del mulo 1 in cui IS è stata ottenuta con 10 giorni di trattamento con Desametazone, nel resto del gruppo il rapporto DTH è stato ottenuto con un trattamento della durata di 8 giorni.

Inoltre non sono stati rilevati effetti collaterali comunemente associati ai trattamenti IS, come l'incremento del battito cardiaco.

Successivamente al trattamento IS sei muli hanno presentato uno stato febbrile transitorio registrando temperature di 39 °C. Tale segno clinico è stato considerato correlato con la malattia AIE (Leroux et al., 2004). L'IS ha indotto anche la recrudescenza del virus EHV-1. Tale riattivazione è stata osservata solo in un singolo

tampone nasale del mulo 6 raccolto al 12° giorno post IS e pertanto EHV-1 non è stato considerato come causa di febbre. Nonostante la presenza del virus EHV-1, il mulo n° 6 non ha sviluppato alcun sintomo chiaro di malattia.



Si riporta di seguito un riepilogo delle manifestazioni cliniche rilevate in ogni animale nel periodo successivo al trattamento IS - tabella 3.

MULO 1: durante il corso della sperimentazione non ha evidenziato sintomatologia clinica rilevante riferibile ad AIE, se non una lieve depressione del sensorio la settimana successiva al trattamento con Deametazone.

MULO 2: nel corso della sperimentazione ha evidenziato costantemente una lieve/moderata anemia successiva al trattamento con cortisonici, particolarmente evidente 10 giorni dopo trattamento IS fino alla macellazione.

MULO 3: durante lo studio ha evidenziato costantemente una depressione del sensorio e una lieve anemia/ittero dopo il trattamento IS.

MULO 4: in seguito al trattamento IS ha evidenziato una depressione del sensorio e una lieve anemia/ittero/edema del petto in particolare ad una settimana di distanza dal trattamento IS.

MULO 5: nel corso della sperimentazione ha evidenziato costantemente una lieve/moderata anemia/ittero dopo il trattamento IS, in particolare la settimana successiva al trattamento.

MULO 6: durante il corso della sperimentazione non ha evidenziato sintomatologia clinica rilevante riferibile ad AIE, se non una lieve anemia la settimana successiva al trattamento IS.

MULO 7: durante il corso della sperimentazione non ha evidenziato sintomatologia clinica rilevante riferibile ad AIE.

MULO 8: durante il corso della sperimentazione non ha evidenziato sintomatologia clinica rilevante riferibile ad AIE.

MULO 9: durante il corso della sperimentazione non ha evidenziato sintomatologia clinica rilevante riferibile ad AIE. Anemia e ittero rilevati saltuariamente nel periodo successivo al trattamento IS.

MULO 10: durante il corso della sperimentazione non ha evidenziato sintomatologia clinica rilevante riferibile ad AIE. Anemia rilevata saltuariamente nel periodo immediatamente successivo al trattamento IS.

Tabella 3: riepilogo delle osservazioni cliniche successivamente al trattamento IS con relativa legenda

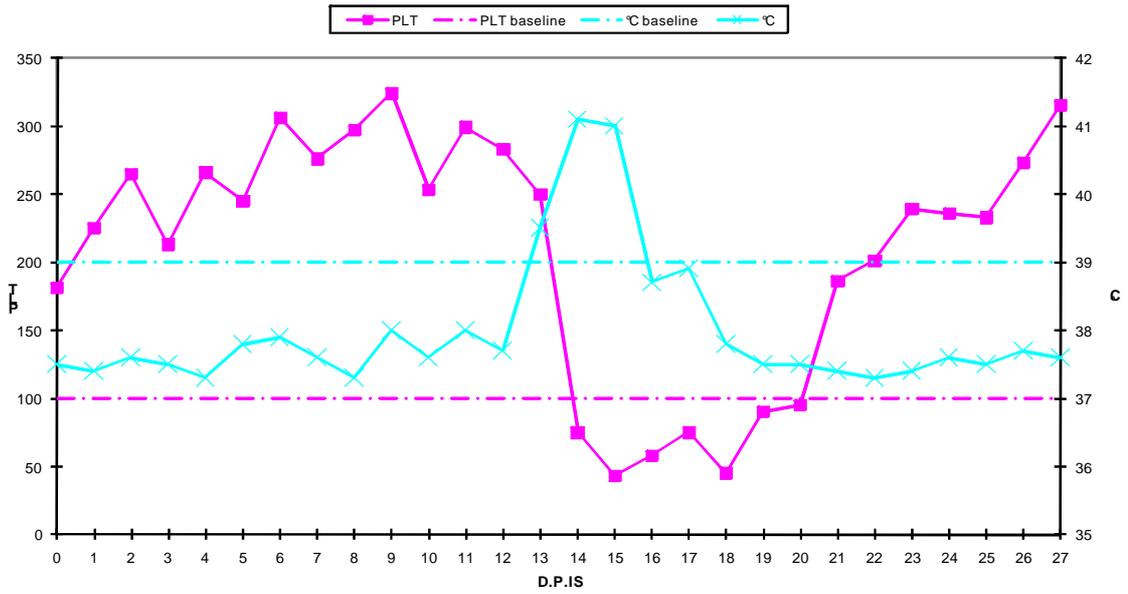
D.P.IS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9		H								
10										P
11		A, D								P
12		A								
13			A	D	A					A
14		A	A	D						A
15	D		A		J,P,D		D		D	
16			A,D	A	J			A		
17	D		D	D						
18	H	A	J	A		A			A	A
19		A		A,J	A	A,J				
20	D	A	A,J	E,A	A	A		A	A	
21		A	A	E	A					
22		A			A					
23			D							
24		A			A	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

legenda

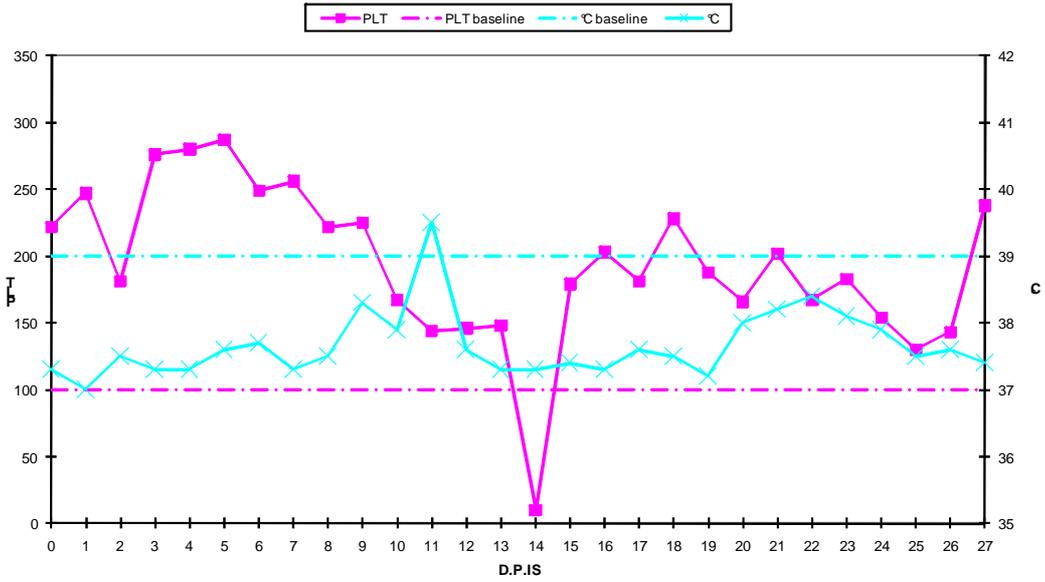
	febbre	A	anemia	H	iperemia
	trombocitopenia	D	depressione	J	ittero
	febbre e trombocitopenia	P	polipnea	E	edema

Si riportano, per ogni singolo animale, i grafici relativi ai rilievi clinici per quanto riguarda la misurazione della temperatura rettale (espressa in gradi celsius sull'asse delle ordinate a destra) e i valori del conteggio delle PLT($1 \cdot 10^5/\mu\text{l}$ sull'asse delle ordinate a sinistra), osservati nei 27 giorni successivi al trattamento IS (giorni post trattamento IS -D.P.I.S.- sull'asse delle ascisse). Nelle tabelle 4 e 5 si riportano rispettivamente i muli che hanno avuto trombocitopenia (valori inferiori a $1 \cdot 10^5/\mu\text{l}$) e temperatura rettale superiore a $> 39^\circ\text{C}$.

MULO 1

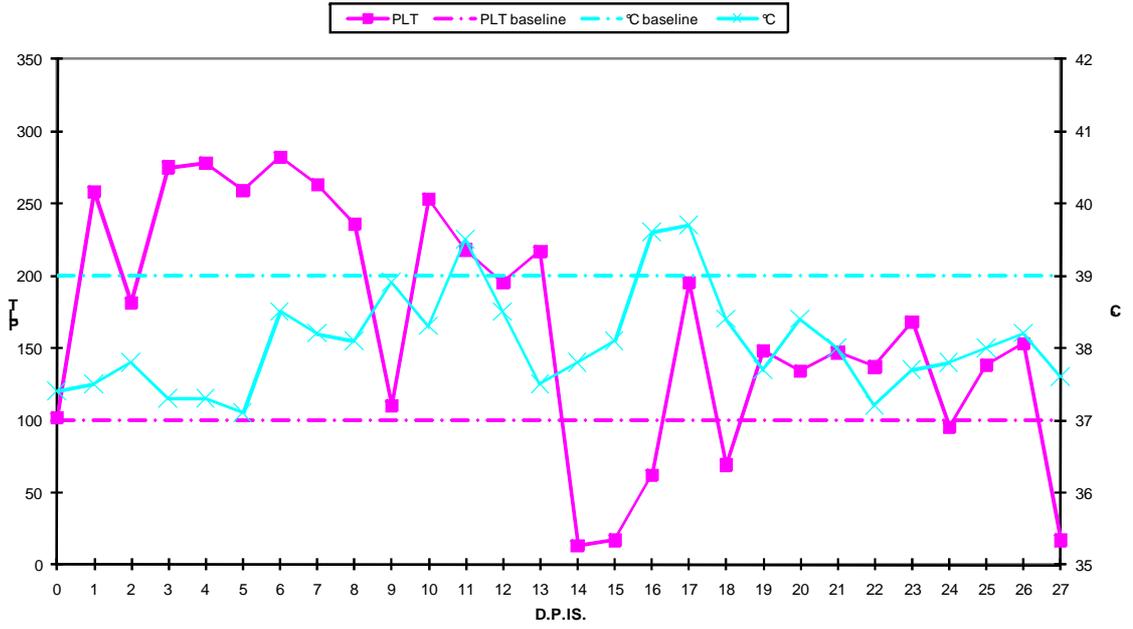


MULO 2

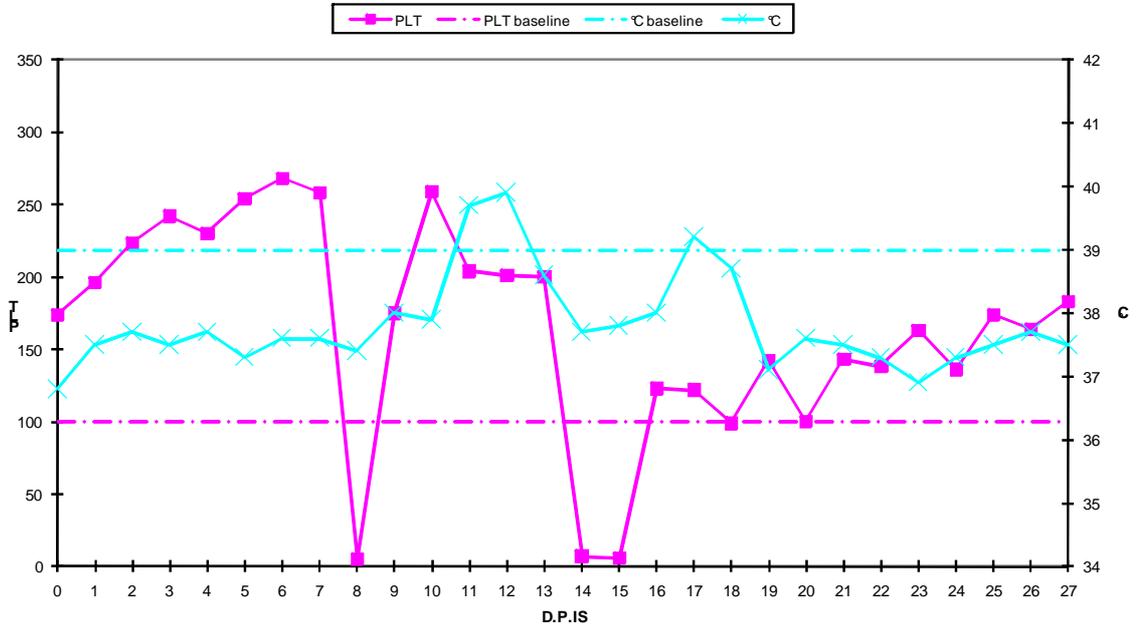


MULO 3

mule 3

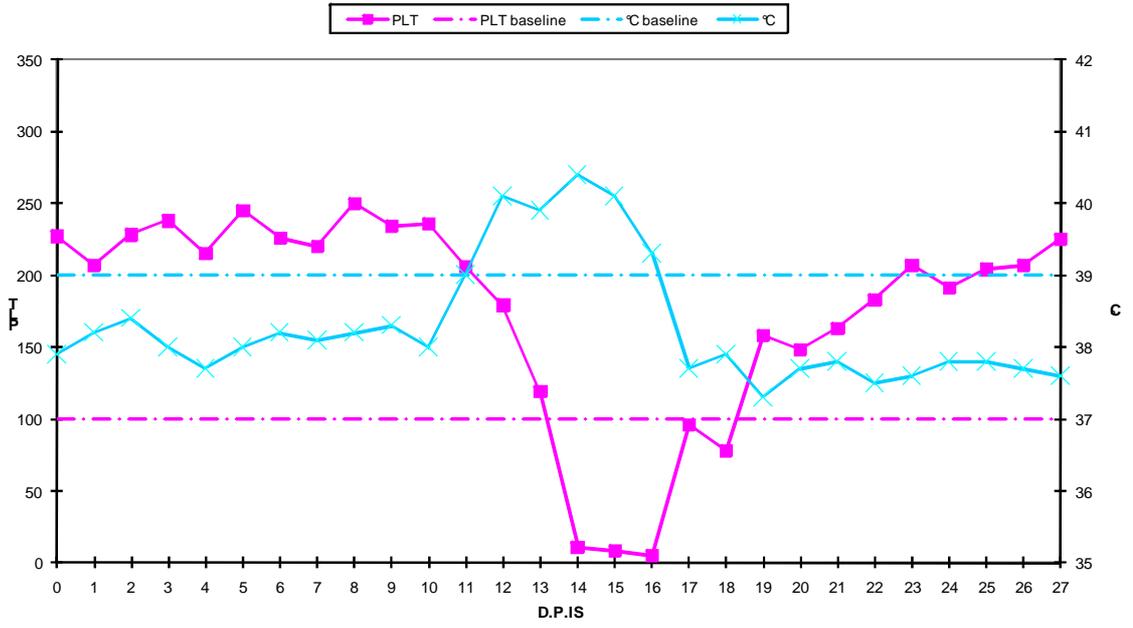


MULO 4

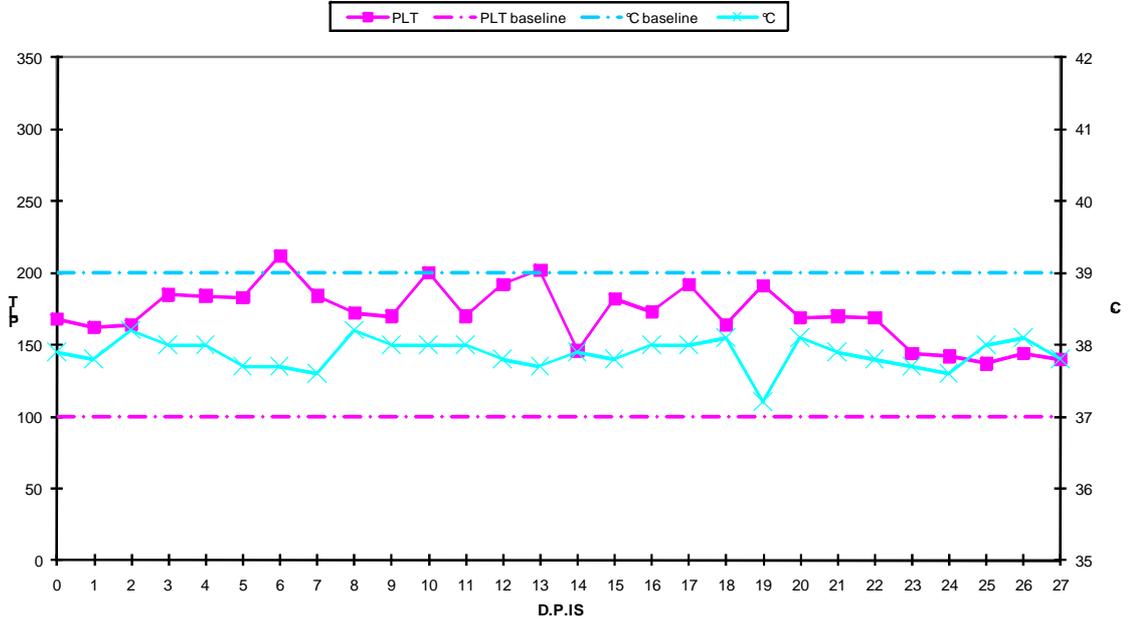


MULO 5

mule 5

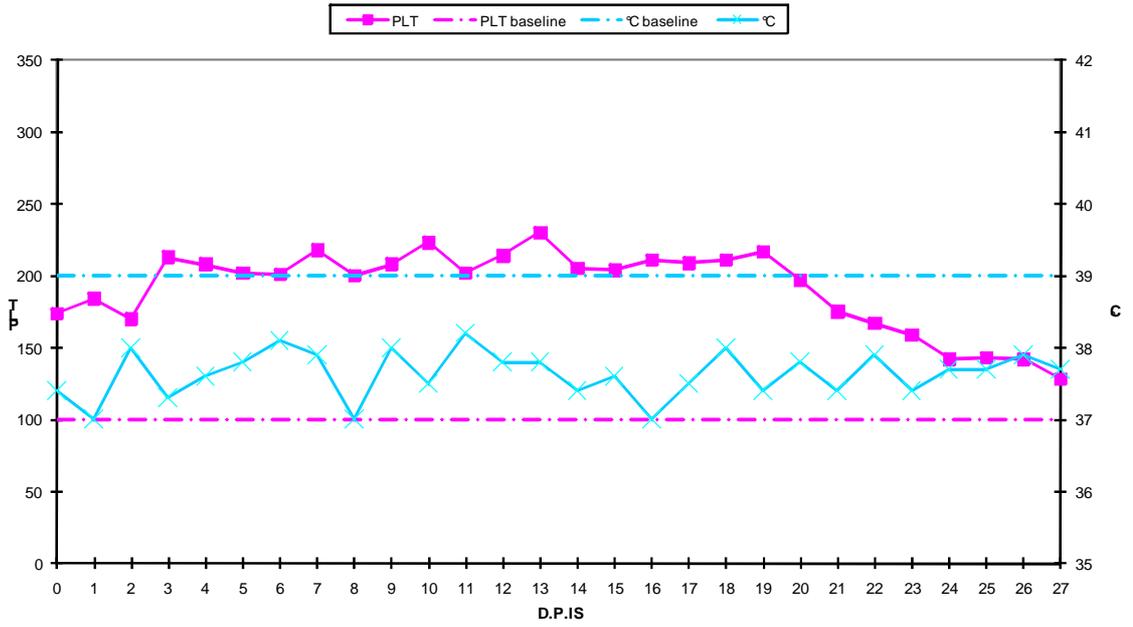


MULO 6

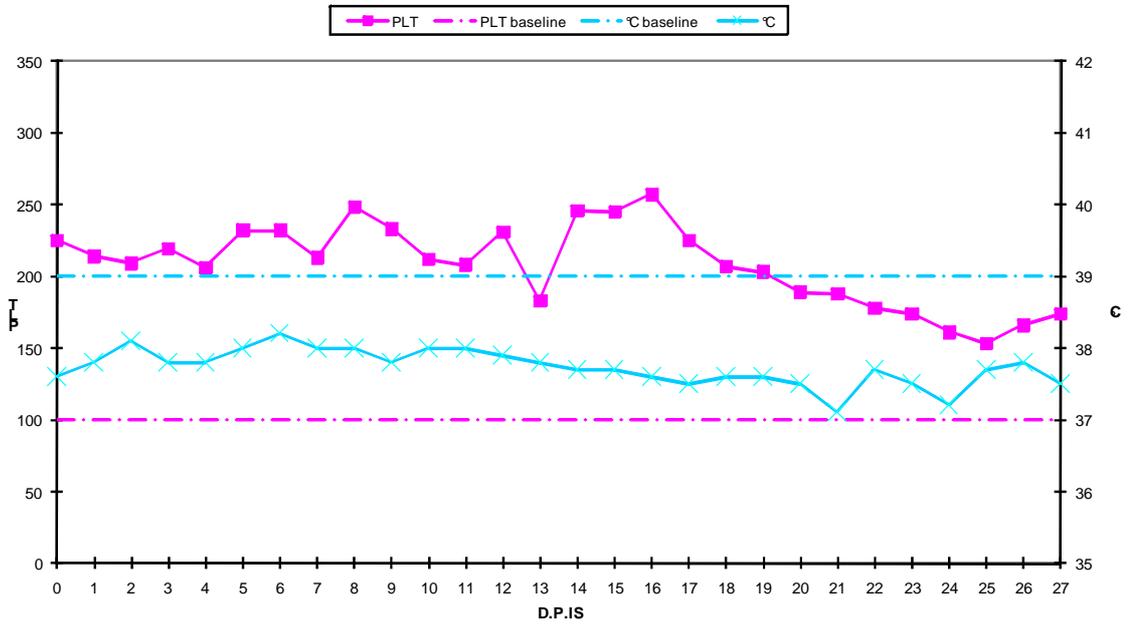


MULO 7

mule 7

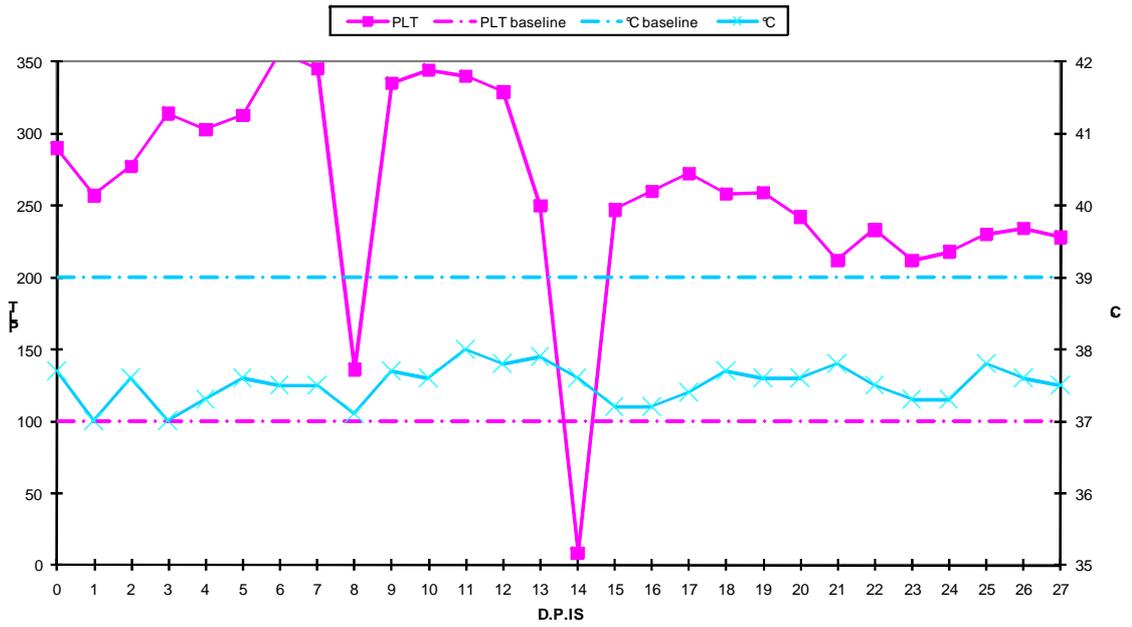


MULO 8



MULO 9

mule 9



MULO 10

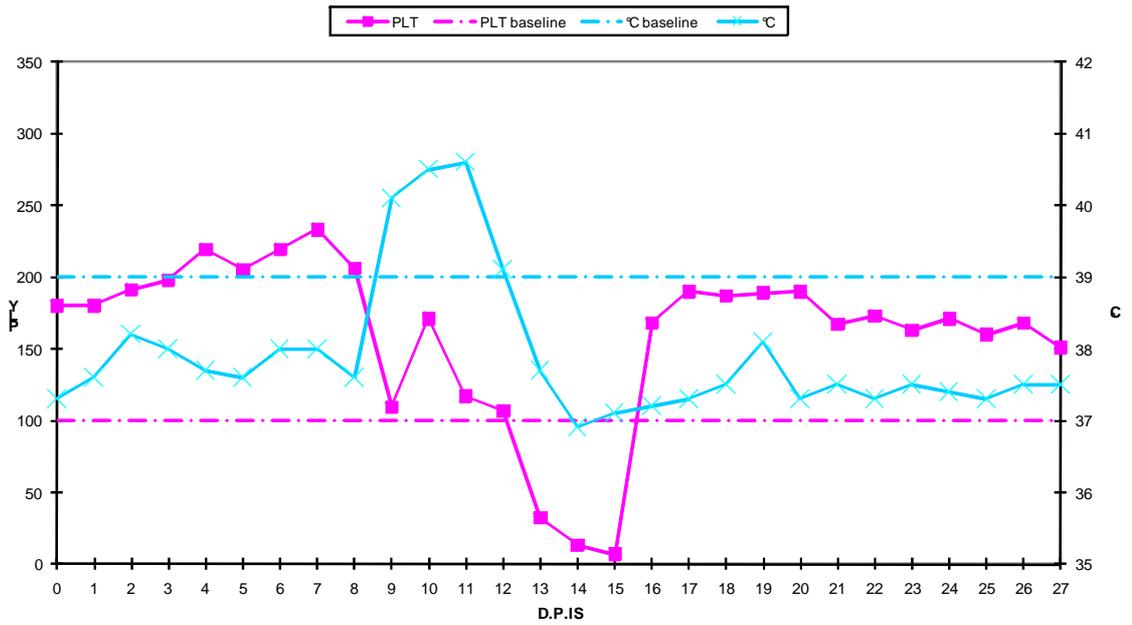


Tabella 4: riepilogo dei soggetti con livelli di PLT al di sotto del valore di riferimento $1 \cdot 10^5/\mu\text{l}$ successivamente al trattamento IS.

D.P.IS.	Muli						
	1	2	3	4	5	9	10
8				5			
14	75	10	13	7	11	8	13
15	43		17	6	8		7
16	58		62		5		
17	75				96		
18	45		69	99	78		
19	90						
20	95						
24			95				
28			17				

Tabella 5: riepilogo dei soggetti con temperatura rettale superiore a 39°C successivamente al trattamento IS.

D.P. IS.	Muli					
	1	2	3	4	5	10
9						40.1
10						40.5
11		39.5	39.5	39.7		40.6
12				39.9	40.1	39.1
13	39.5				39.9	
14	41.1				40.4	
15	41				40.1	
16			39.6		39.3	
17			39.7	39.2		
21						
22						
23						
24						

Risposta sierologica

I risultati dell'analisi sierologica al test AGID e quelli al test C-ELISA sono riportati rispettivamente nella tabella 6 e 7. I dati presentati si riferiscono alle osservazioni cliniche effettuate una settimana prima e quattro settimane dopo la prima somministrazione di desametazone perché gli esiti sierologici antecedenti ai periodi sopra riportati sono identici a quelli rilevati al 7 giorno precedente al trattamento IS.

I risultati degli esami sierologici al test AGID sono stati classificati facendo la somma dei punteggi degli score nel periodo di riferimento. Anche per il test C-ELISA è stata fatta la stessa cosa ma riportando il reciproco della diluizione ottenuta al test.

I risultati classificati in questo modo hanno portato a designare due livelli di reattività negli animali oggetto di studio, un gruppo ad alta reattività, definito come gruppo P che include i muli 1, 2, 4, 9 e 10 ed un gruppo a bassa reattività gruppo N, che include i muli 3, 5, 6, 7 e 8.

Gli animali classificati nel gruppo P ed N con il test AGID e quelli classificati con il test C-ELISA erano gli stessi, come riportato nella tabella 6 e 7, indicando una correlazione della reattività rilevata dai due metodi sierologici. Al tempo stesso è importante notare che gli animali che nella tabella 2 sono stati descritti avere una reazione negativa al test AGID sono gli stessi di quelli inclusi nel gruppo N.

Inoltre abbiamo rilevato che il trattamento IS ha avuto un minimo impatto sulla risposta umorale. I muli del gruppo N, soggetti 3 e 6 sono rimasti negativi al test AGID, mentre il mulo 7 ha registrato un positività con score 1 altalenante, invece il mulo 8 ha mantenuto una debole positività pari ad 1 per tutto il periodo di osservazione successivo al trattamento IS. Solo per il mulo 5 è stata registrata un

aumento della risposta umorale al test AGID passando da uno score 1 a 2 nei 28 giorni successivi al trattamento IS (tabella 6).

Risultati simili sono stati ottenuti nel gruppo P , in cui un aumento apparente della reattività al test AGID è stata osservata solo nel mulo 9 e 10 (tabella 7). In linea di massima, il test ELISA, che presenta una maggiore sensibilità, ha rispecchiato questi risultati. Tre muli del gruppo N non hanno registrato un aumento significativo del titolo in ELISA sia prima che dopo il trattamento IS incluso il mulo 6 che è rimasto negativo per tutto il periodo dell'esperimento (tabella 7).

Inoltre abbiamo notato che il mulo 5 ha mostrato un aumento del titolo al test ELISA di ben 16 volte, confermando così i risultati del test AGID, mentre un incremento più modesto pari a 4-8 volte è stato osservato nel mulo 7 (tabella 7). Per quanto riguarda il gruppo P, il titolo in ELISA per i muli 1, 2 e 4 è rimasto relativamente costante sia prima che dopo il trattamento IS, il mulo 9 ha registrato un aumento del titolo anticorpale al test ELISA di 12-24 volte, mentre il mulo 10 ha registrato un incremento del titolo anticorpale al test ELISA di tre volte. Pertanto da quanto riportato possiamo affermare che i risultati in ELISA sono stati concordi con gli esiti al test AGID. Per quanto concerne gli esiti al test IB, i sieri degli animali sia del gruppo N, sia del gruppo P esaminati alla diluizione 1/20 hanno reagito positivamente, registrando positività per la proteina p26, gp45 e gp 90. Al riguardo abbiamo osservato che i sieri esaminati alla diluizione 1/20 non mostravano alcuna differenza sia prima che dopo il trattamento IS. Diversamente, quando gli stessi sieri erano saggiati al test IB alla diluizione di 1/80, si osservava un aumento della reattività per la proteina gp45 nel mulo 6, 7 e 8 nel periodo successivo al trattamento IS (figura 3A,B,C)

È molto interessante notare che gli animali che hanno manifestato un aumento della reattività per la proteina gp45 appartengono tutti al gruppo N e che per contro registravano una bassa reattività al test C-ELISA/AGID e di questi 3 soggetti solo il mulo 7 ha registrato una sierconversione al test C-ELISA che impiega, come riportato nei materiali e metodi, la proteina 26 del virus dell'AIE.

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

Giorni pre e post IS	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

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

Giorni pre e post IS	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

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

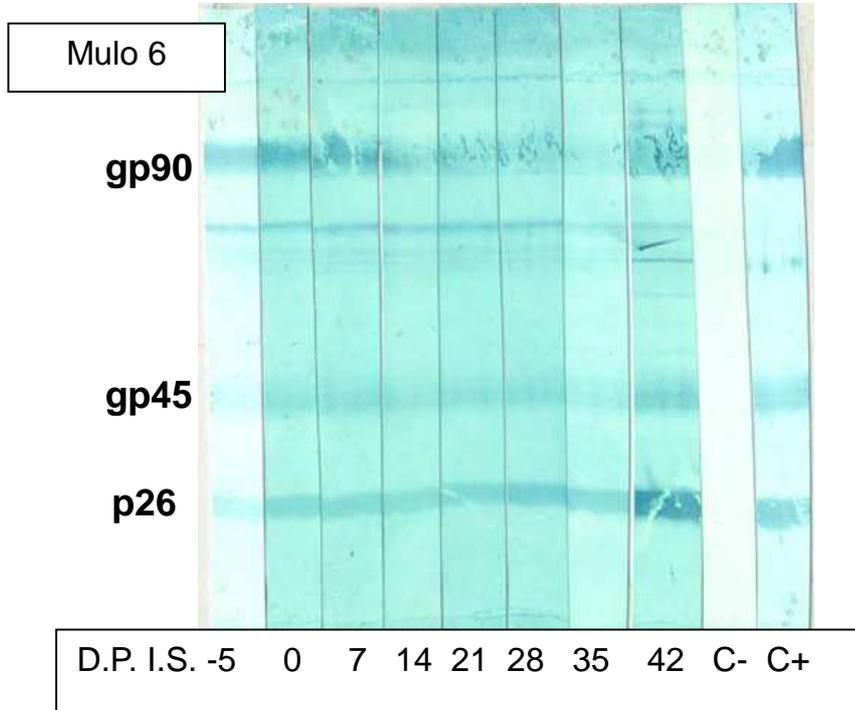


Figura 3 B: esiti al test IB mulo 7 – sieri esaminati alla diluizione 1/80.

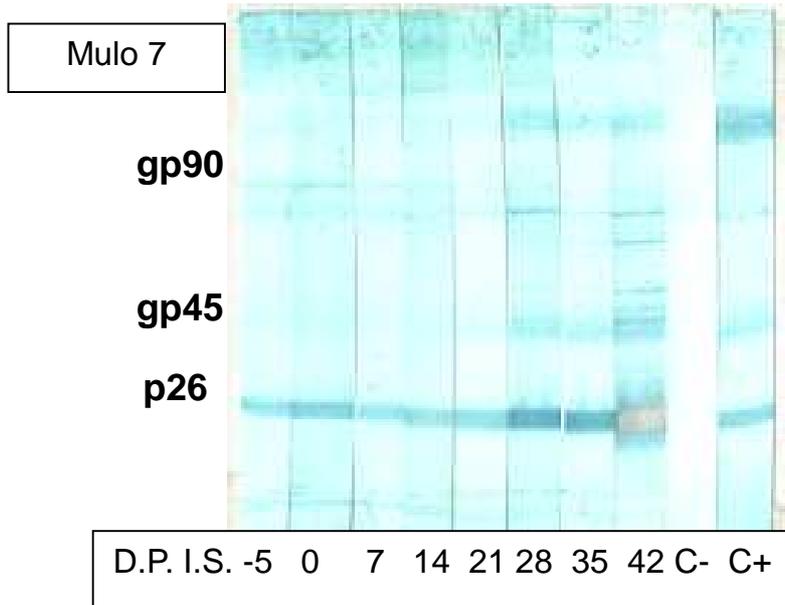
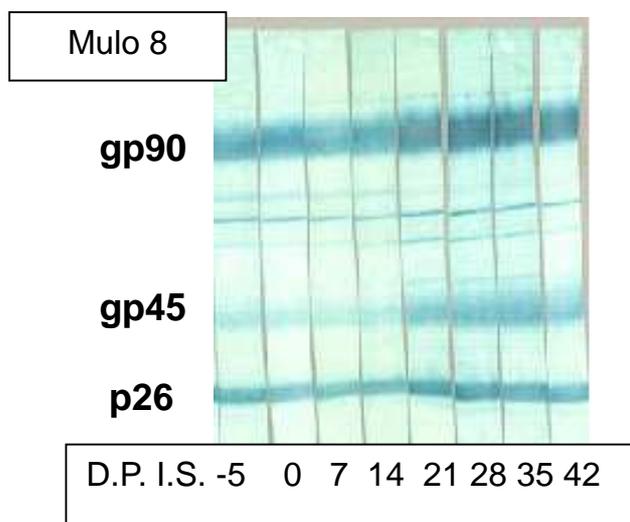


Figura 3 C: esiti al test IB mulo 8 – sieri esaminati alla diluizione 1/80.

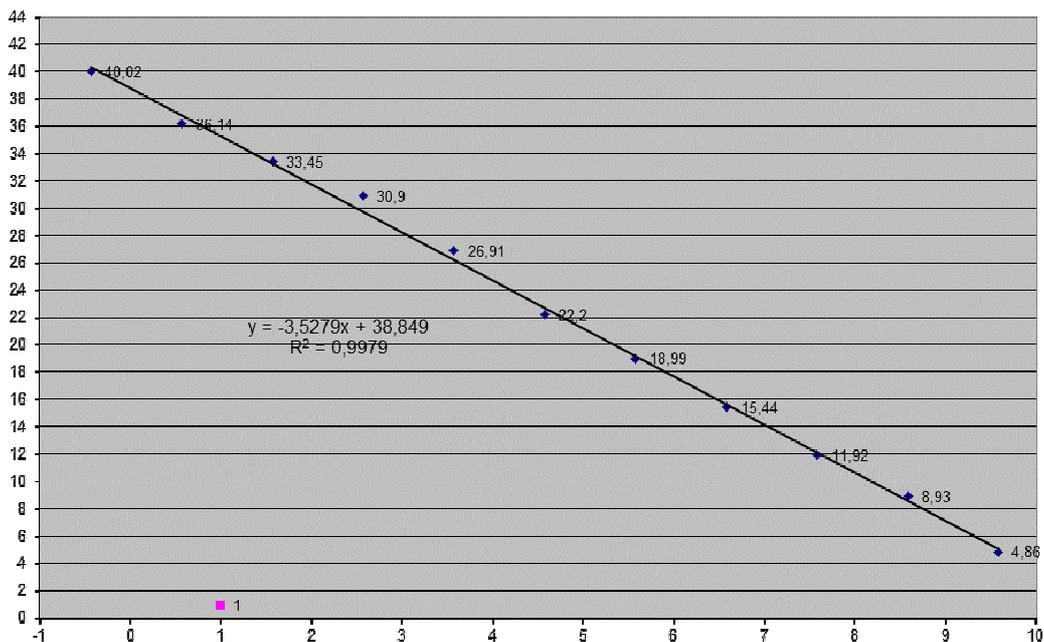


Stima della carica virale mediante RT-PCR quantitativa

La curva standard ottenuta utilizzando diluizioni seriali in base 10 (log10) di un trascritto di virus AIE derivato dal RNA è stata lineare (valore del coefficiente di regressione uguale a 0,9932) con un intervallo che variava da 10^9 per un Ct = 4,86 a 0,4 molecole per 50 μ l per un Ct = 40,02. 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 ottimo funzionamento dei primers selezionati. L'efficienza del test è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$ 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 e relativo all'esone 1 del gene tat; inoltre è stato appurato che la linearità del saggio di Real time RT-PCR è compresa tra 10^9 molecole (con Ct=4,86) e circa 0,4 molecole (con Ct = 40,02) di RNA 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 di virus AIE derivato dal RNA, sono state usate per determinare la quantificazione assoluta (vRNA loads) in tutti i campioni raccolti nel periodo di osservazione prima e dopo trattamento IS.

L'evoluzione temporale della carica di RNA virale per l'intero periodo è riportata nel grafico 9 per il gruppo N e nel grafico 10 per il gruppo P, mentre la tabella 8 riporta la sintesi dei risultati dei saggi di PCR quantitativa qRT-PCR dei campioni di plasma raccolti dai muli prima e dopo trattamento IS.

Il RNA virale plasma associato è stato rilevato in uno o più campioni raccolti prima del trattamento IS da sei dei muli naturalmente infetti di questo studio, inclusi i muli 3 e 5 che presentavano una reattività al test di AGID da negativa a molto debole (tabelle 9 e 10). Al riguardo bisogna dire che il rilevamento di RNA virale nei muli 3 e 5 non è stato limitato ad un singolo evento ma ha addirittura raggiunto e talvolta superato il numero di copie di RNA osservato prima del trattamento IS di alcuni animali (muli 1,2 e 10) del gruppo P, come si può vedere nei grafici 9 e 10 i quali registravano una forte reazione al test AGID. Un altro risultato inaspettato è stato che in alcuni animali del gruppo P (muli 1, 2, 4 e 10) e del gruppo N (muli 3, 5), vedi grafici 9 e 10, vi è stata una notevole variazione della carica RNA virale plasma associata registrando per il mulo 5 un valore più alto di 5.48 log₁₀ durante i primi 56 giorni di osservazione precedenti al trattamento IS.

Come predetto, il trattamento con desametazone ha indotto un notevole aumento della carica RNA virale plasma associata in tutti e 10 i muli, sebbene la variazione differisce di 4.48 log₁₀ tra gli animali e la durata del picco di RNA virale varia tra il 9 - 19 giorno dopo il trattamento IS (tabella 8). Al riguardo fa eccezione il mulo 1 per il quale il picco di RNA virale è stato rilevato 7 giorni prima del trattamento IS. È da notare che queste differenze individuali in carica di RNA virale plasma associata,

registrate successivamente al trattamento IS, non hanno avuto evidente correlazione con la reattività sierologica al test AGID.

In aggiunta non è stata registrata un'apparente correlazione tra il picco del titolo di RNA virale plasma associato e la risposta al test ELISA dopo il trattamento IS.

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 log₁₀/ml di plasma per ciascun animale e si riferisce ai giorni di campionamenti effettuati prima e dopo trattamento IS.

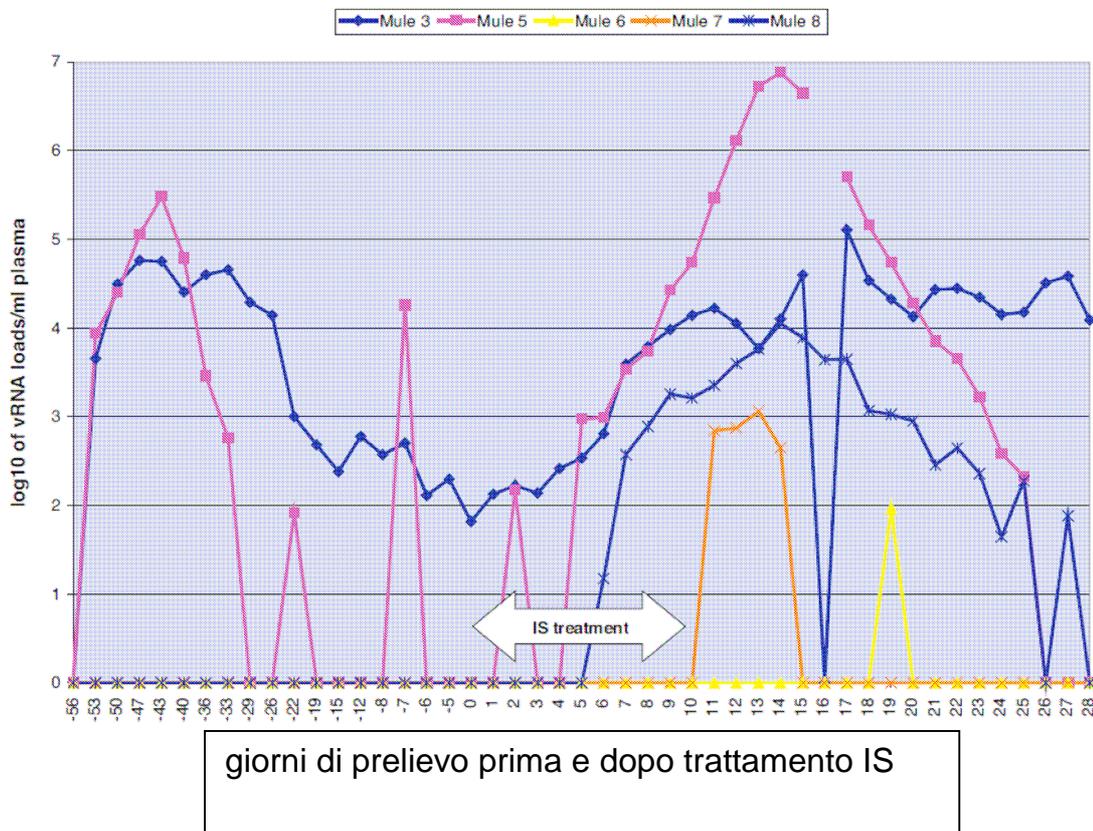


Grafico 10: Evoluzione temporale della carica RNA virale plasma associata nel gruppo P (Muli 1, 2, 4, 9 e 10). La carica di RNA virale è riportata come copie \log_{10}/ml di plasma per ciascun animale e si riferisce ai giorni di campionamenti effettuati prima e dopo trattamento IS..

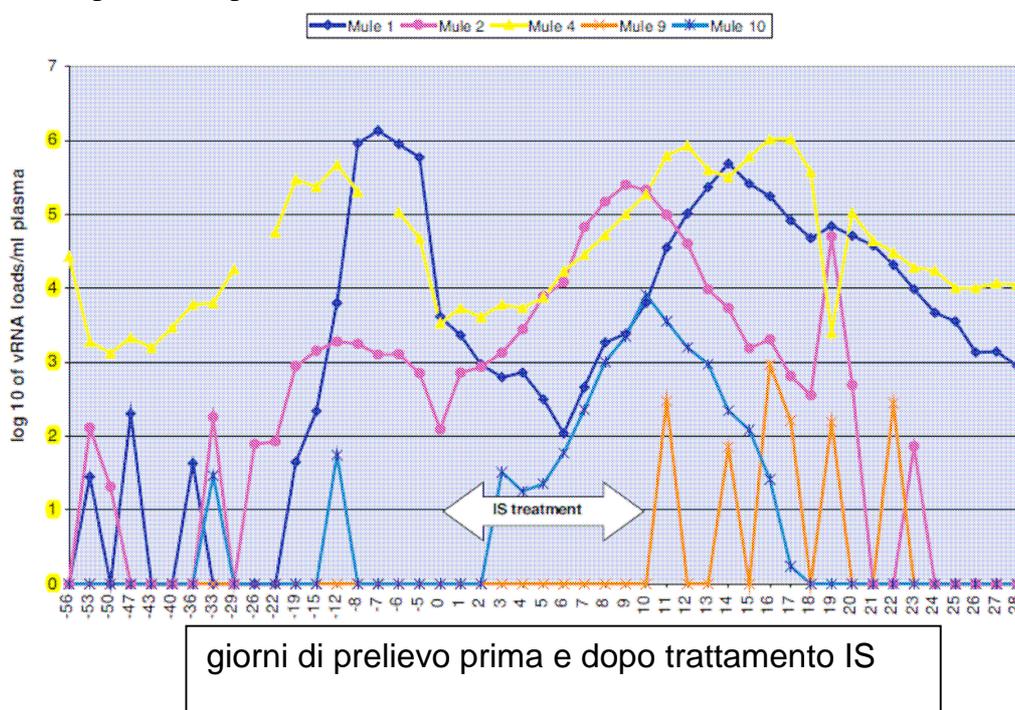


Tabella 8: Sintesi dei risultati sei saggi di qRT-PCR raccolti prima e dopo trattamento IS^a

Muli	Numero dei campioni testati	Numero dei positivi	% di positivi	picco viremico ^b	giorno di rilevamento del picco viremico ^c
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 I muli dopo il 56 giorno di osservazione hanno ricevuto una dose di desametonone pari a 0.11 mg/kg di peso vivo per 8 giorni consecutivi, ad eccezione del mulo 1 che è stato trattato per 10 giorni. Ogni mulo è stato saggiato mediante saggio qRT-PCR 19 volte prima del trattamento IS, eccetto per il mulo 4 che è stato testato 17 volte; ogni mulo è stato campionato quotidianamente per 28 giorni post trattamento IS eccetto che per il mulo 5, testato 27 giorni.

^b Il titolo RNA virale è stato stimato a partire dai valori di Ct ed espresso come \log_{10} di copie di RNA/ml.

^cGiorno in cui è stato registrato il titolo più alto di RNA virale; il simbolo “-” indica che il giorno di massima viremia era precedente al trattamento IS mentre il simbolo “+” indica che il giorno di massima viremia è stato registrato dopo il trattamento IS.

Sequenziamento dei prodotti della Nested –PCR

Il sequenziamento dei prodotti della nested-PCR ha confermato che tutti i muli erano infetti dal virus dell'AIE , validando pertanto la risposta sierologica osservato durante questo studio.

La ricerca effettuata mediante utilizzo di Nucleotide BLAST ha dimostrato che tutti i muli erano stati infettati da ceppi virali di AIE simili a quelli precedentemente riportati come ceppi europei da Quinlivan e al. (2007) e Cappelli e al. (2011) con una similitudine nucleotidica variabile da 77 a 96%.

In dettaglio le sequenze di sei animali (muli 1, 2, 6, 7, 9 e 10) avevano una similitudine con il ceppo virale AIE EIAVRom-4 (GU060662.1), due soggetti (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). I dati appena sopra descritti devono essere considerati preliminari, specialmente perché la similitudine di alcuni isolati rispetto ad alcuni ceppi noti era pari al 77%.

Dal momento che la regione sequenziata è piuttosto breve, paria a 313 paia di basi (bp), in futuro il sequenziamento di un segmento del gene gag più lungo o di altre regioni del genoma del virus AIE saranno necessarie per meglio definire l'identità dei ceppi rilevati nel presente studio.

Discussioni

Il principale obiettivo di questo studio era quello di allargare il database degli equidi aventi un esito al test AGID negativo/dubbio ma positivo agli altri test sierologici per AIE.

Precedenti studi che hanno coinvolto equidi con pattern di reattività sierologica simili 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 con un volume di sangue eparinizzato da 5 a 300 ml o preparazioni di monociti lavati a partire da volumi di sangue intero variabili da 300–500 ml (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 dato il numero ridotto di soggetti coinvolti, pertanto i dati che ne derivano non sono stati elaborati statisticamente.

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 il virus dell'AIE e quindi la malattia.

Infatti, come dimostrato in questo studio, il rischio legato alla carica viremica tessuto associata può cambiare significativamente in alcuni equidi anche su base giornaliera. Sfortunatamente, il rilievo di animali con un basso titolo di anticorpi specifici rappresenta 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 aumentare la trasmissione della malattia.

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 scorretta 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 per AIE anche in termini di tecnologia moderna.

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.

Il fatto che le due metodiche di PCR impiegate in questo studio sono state capaci di amplificare sequenze virali in tutti i 10 soggetti suggerisce che sequenze verso cui sono diretti i primers e la sonda (nel caso del saggio Taqman[®]) sono molto conservate almeno per i ceppi isolati in Europa. Tuttavia è da notare che sequenze virali non sono state amplificate da tutti i campioni prelevati e che sequenze virali sono state rilevate in alcuni muli solo nel periodo post trattamento IS.

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.

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

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 dovrebbe 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 strumenti diagnostici addizionale e

una migliore standardizzazione della 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 il test IB appare essere il test di scelta per gli equidi infetti. Questa considerazione scaturisce dal fatto che la risposta immunitaria nei confronti delle proteine gp90 e gp45 può essere evidenziata dal test IB, anche se le proteine dell'envolope sono presenti nelle particelle virali in bassissima quantità in confronto all'antigene p26. Sfortunatamente ad oggi kits commerciali in grado di rilevare le proteine gp90 e gp45 non sono ancora disponibili. Il test IB utilizza il virus dell'AIE prodotto in laboratorio a partire dal ceppo Wyoming del virus AIE ed è interessante notare che risulta efficace nel rilevare anticorpi contro ceppi virali circolanti in un elevato numero di territori distanti (Europa, Asia e continente Americano). Questa ampio spettro di utilizzo è legato alla proteine dell'envolope di questo ceppo che contengono un alto numero di epitopi reattivi anche allo stato denaturato in cui si presentano sulle membrane dell'IB. Considerando la diagnosi di AIE complessivamente possiamo concludere che i dati clinici, sierologici o virologici presi singolarmente non garantiscono un'elevata accuratezza. Con i dati esposti possiamo concludere che il test IB utilizzando il ceppo del virus AIE Wyoming adattato su cellule risulta allo stato attuale il test più efficace nel rilevare anticorpi anti virus AIE. 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 all'AIE nei differenti metodi diagnostici che non sono 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 indidenti.

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.

BIBLIOGRAFIA

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 EIAV 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 (EIAV) gag genes isolated from Shackelford Banks wild horses*. *Veterinary Microbiology* 157, 320–332;

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- α 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.

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.

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., Craig 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;

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;

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;

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;