



Università degli Studi di Torino

Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed  
Ecologia

Scuola di Dottorato in Scienze Veterinarie

Indirizzo Produzioni Animali

XXII ciclo

Sviluppo di metodologie biomolecolari per l'identificazione e lo studio di  
piroplasmi appartenenti  
a *Babesia spp.*

Tesi presentata dal dott. Angelo Romano

Tutor: Prof. Ezio Ferroglio

Coordinatore del Dottorato: Prof. Antonio D'Angelo

Anni Accademici: 2007-2009

SSD VET/06

<b>Introduzione</b>	<b>5</b>
<b>Inquadramento Bibliografico</b>	<b>6</b>
<b>Morfologia, Classificazione ed Identificazione</b>	<b>7</b>
<b>Ciclo Biologico</b>	<b>9</b>
<b>Patogenesi</b>	<b>11</b>
<b>Diffusione</b>	<b>12</b>
<i>La diffusione in Italia</i>	<i>15</i>
<b>Una zoonosi emergente</b>	<b>17</b>
<b>Diagnosi Tradizionale</b>	<b>18</b>
<b><i>TECNICHE DIAGNOSTICHE DIRETTE</i></b>	<b><i>18</i></b>
OSSERVAZIONE SANGUE PERIFERICO	18
<b><i>TECNICHE DIAGNOSTICHE INDIRETTE</i></b>	<b><i>20</i></b>
TECNICA IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA	20
FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO	21
ELISA INDIRETTA (Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay)	22
<b>Nuove diagnosi con metodi di biologia molecolare</b>	<b>24</b>
<b><i>Standard PCR</i></b>	<b><i>24</i></b>
<b><i>Reverse line blotting</i></b>	<b><i>25</i></b>
<b><i>Real Time PCR</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b>Contributo Sperimentale</b>	<b>28</b>
<b>Obiettivo del lavoro</b>	<b>28</b>
<b>Organizzazione del lavoro</b>	<b>29</b>
<b>Materiali e Metodi</b>	<b>30</b>
<b>Campioni</b>	<b>30</b>
<b>Estrazione del DNA</b>	<b>32</b>

<i>Estrazione del DNA da sangue coagulato</i>	32
<b>PCR specie specifica</b>	<b>33</b>
<i>Babesia equi-Babesia caballi</i>	33
<i>Babesia canis</i>	34
<b>PCR catch all</b>	<b>36</b>
<b>PCR seminested catch all</b>	<b>37</b>
<b>Reverse Line Blot</b>	<b>39</b>
<b>PCR Real Time</b>	<b>42</b>
<i>Catch all</i>	42
<b>Clonaggio e Sequenziamento</b>	<b>43</b>
<b>Risultati</b>	<b>45</b>
<b>Ricerca Babesia equi e Babesia caballi</b>	<b>45</b>
<b>Ricerca Babesia canis</b>	<b>46</b>
<b>Ricerca di Babesia spp in animali selvatici</b>	<b>47</b>
<b>Reverse Line Blot</b>	<b>49</b>
<b>PCR Real Time</b>	<b>50</b>
<i>Catch all</i>	50
<b>Sequenziamento</b>	<b>51</b>
<i>Analisi Filogenetica</i>	56
Maximum likelihood	57
Maximum parsimony	57
Neighbour-joining	57
<b>Conclusioni</b>	<b>59</b>
<b>Metodologie biomolecolari</b>	<b>59</b>
<b>Babesia spp in animali domestici</b>	<b>62</b>
<b>Babesia spp in animali selvatici</b>	<b>63</b>

<b>Conclusione generale</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>68</b>
<b>Percorso Formativo</b>	<b>73</b>
<b>Programma Formativo I anno</b>	<b>73</b>
<b>Programma Formativo II anno</b>	<b>74</b>
<b>Programma Formativo III anno</b>	<b>76</b>

# Introduzione

Le babesiosi sono malattie parassitarie sostenute da protozoi intraeritrocitari appartenenti al genere *Babesia*, ad oggi sono state identificate più di 100 specie di *Babesia*, e colpisce sia animali domestici sia parecchi animali selvatici: bovini (*B. bigemina*, *B. bovis*, *B. divergens* e *B. major*), ovini e caprini (*B. motasi* e *B. ovis*), equini (*B. caballi* e *B. equi*), suini (*B. perroncitoi* e *B. trautmanni*), canidi (*B. canis* e *B. gibsoni*), roditori (*B. microti*) e ungulati selvatici (*B. capreoli* e *B. odocoilei*).

La trasmissione avviene tramite puntura di artropodi ematofagi durante il pasto di sangue e possono essere coinvolti vari tipi di zecche appartenenti alla famiglia *Ixodidae* a seconda della specie e della sottospecie di *Babesia* presa in considerazione.

La diffusione è cosmopolita, si ritrova in tutta la fascia a clima temperato e rappresenta un problema sia in aree in via di sviluppo, Africa e Asia, sia in Europa e Nord America dove colpisce animali da reddito e da compagnia. (Vannier and Krause 2009)

Nell'uomo è ritenuto un problema "emergente" dato che ormai il numero di segnalazioni di infezioni in umana ha raggiunto livelli considerevoli sia in Europa continentale sia in Nord America e in Giappone. (Herwaldt, Caccio et al. 2003)

La diagnosi diretta è eseguita con l'identificazione del parassita su striscio di sangue, mentre quella indiretta con test sierologici, però limitati per problemi di cross-reattività. (Sambri, Marangoni et al. 2004) Relativamente recenti sono test diagnostici di biologia molecolare, quali Reverse Line Blot e varie PCR homemade.

# Inquadramento Bibliografico

Alla fine del diciannovesimo secolo Babes segnalò dei microrganismi osservati negli eritrociti di un allevamento di bovini in Romania, la cui presenza era associata a emoglobinuria. (Babes 1888) Poco tempo dopo osservò un tipo simile di microrganismo nelle cellule eritrocitarie di un gruppo di pecore. Nel 1893 l'agente causale della Febbre del Texas prese il nome di *Pyrosoma bigeminum* (Smith and Kilborne 1893) e questa fu la prima segnalazione di trasmissione per mezzo di un artropodo di un parassita protozooario. Nello stesso anno, Stracovici diede a questi parassiti rispettivamente il nome di *Babesia bovis*, *Babesia ovis* e *Babesia bigemina* e *Babesia* divenne il nome del genere. (Uilenberg 2006) Il nome "piroplasmii" deriva dal fatto che i parassiti, dopo la replicazione, risultano piriformi. La vecchia denominazione *Piroplasma* sopravvive con questa connotazione e anche per il fatto che le babesiosi e le theileriosi sono di solito raggruppate come "piroplasmosi". (Uilenberg 2006)

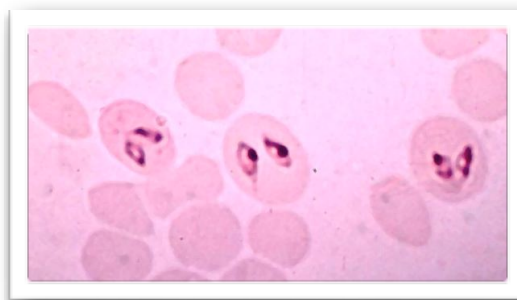


Fig. 1: Esempio di *Babesia bovis*

## Morfologia, Classificazione ed Identificazione

Ormai è accertato il fatto che tutte le specie di *Babesia* sono trasmesse da zecche. Gli sporozoiti sono iniettati nell'ospite con la saliva e infettano direttamente gli eritrociti. A questo punto gli sporozoiti si sviluppano in piroplasmii, con una moltiplicazione che solitamente dà luogo a 2 o 4 cellule figlie che lasciano la cellula ospite e infettano un'altra cellula sanguigna. La moltiplicazione può continuare fino alla morte dell'ospite o più frequentemente fino a che il sistema immunitario non frena questa replicazione. Le Babesie non formano pigmenti nelle cellule parassitate, caratteristica che le distingue senza dubbio dai generi *Plasmodium* e *Haemoproteus*; apparentemente infatti l'emoglobina viene digerita e non si hanno residui di questo genere.

I parassiti del genere *Babesia* sono quindi definiti parassiti che, una volta iniettati nell'ospite, entrano direttamente negli eritrociti, in contrasto con gli sporozoiti di *Theileria* che penetrano in linfociti o macrofagi dove si sviluppano in schizonti. A questo punto i merozoiti rilasciati dagli schizonti penetrano nei globuli rossi, dove crescono come piroplasmii e si moltiplicano in quattro cellule figlie formanti una tetradе chiamata "croce Maltese".

Da qui la definizione di *Babesia* come parassiti che si riproducono solo negli eritrociti e ciò implica che come vengono ritrovate forme di schizonti negli ospiti vertebrati, questi parassiti non possono più essere classificati come appartenenti al genere *Babesia*.

Per circa 70 anni, l'unico strumento disponibile per lo studio dei piroplasmii è stato il microscopio ottico, in questo modo le caratteristiche fenotipiche più evidenti, come la loro morfologia e il fatto di infettare gli eritrociti sono state classificate in dettaglio. Furono anche stabilite la patogenicità, le lesioni causate negli animali infetti, i vettori e i modi di trasmissione. Questa grande mole di informazioni e l'identificazione di nuovi parassiti ha visto la necessità di periodiche revisioni della classificazione degli organismi. (Allsopp and Allsopp 2006) Nel 1930, Donatien e Lestoquard (Donatien and Lestoquard 1930) sottolineavano come fosse necessario utilizzare al meglio tutte le possibili informazioni per classificare correttamente questi microorganismi; informazioni che comprendevano: la morfologia, la patogenesi e "caratteri di tipo biologico". Con l'avvento della microscopia elettronica e la sua applicazione allo studio dei piroplasmii una nuova mole di informazioni ultrastrutturali è stata a disposizione. Per la prima volta è stato possibile determinare la struttura interna e i cambiamenti morfologici di tutti gli stadi del ciclo vitale e confermare il legame di questi parassiti con altri quali ad esempio *Plasmodium* e i coccidi. (Levine 1971) Questi nuovi dati hanno messo in luce come alcuni parassiti potevano essere classificati

inequivocabilmente sotto la famiglia delle *Babesiidae* e altri sotto quella delle *Theileriidae*. Rimaneva però un gruppo di parassiti che, mostrando alcune caratteristiche appartenenti ad una famiglia e altre appartenenti all'altra, venivano definiti possedere "una posizione sistematica incerta", includendo tra questi *T. equi*, *B. microti* e *B. gibsoni*. (Melhorn and Schein 1984)

Il sistema più ovvio per chiarire i problemi dovuti a dubbi fenotipici è andare a ricercare al livello di sequenze geniche dell'unità ribosomiale 18S. Questo gene presenta regioni conservate e regioni variabili, le prime danno la possibilità di eseguire allineamenti di sequenza inequivocabili, mentre le seconde permettono di operare discriminazioni filogenetiche. (Allsopp and Allsopp 2006) Le regioni conservate al 5' e al 3' del gene 18S hanno senza dubbio il vantaggio pratico di permettere il disegno di primer per amplificare quasi completamente il gene anche in presenza di DNA di altri organismi. (Zahler, Rinder et al. 2000) L'analisi più comprensiva delle caratteristiche fenotipiche è quella eseguita da Mehlhorn e Schein (1984) che evidenziano un numero di differenze significative tra i membri dei due generi, basate principalmente sugli stadi del ciclo vitale dei parassiti. La caratteristica unica delle babesie e non presente nelle theileire e in altri piroplasmidi di classificazione incerta è la trasmissione transovarica nel vettore e la divisione presente solo negli eritrociti degli ospiti vertebrati.

Per quel che riguarda una caratterizzazione dal punto di vista genotipico, nonostante ormai siano molte le pubblicazioni che descrivono varianti del gene 18S per quel che riguarda *Babesia*, comunque non è possibile riclassificare completamente le specie e le sottospecie solo sulla base della sequenza genetica, in quanto la maggior parte di questi organismi sono stati isolati esclusivamente in campo e non se ne conosce il vettore. (Allsopp and Allsopp 2006) Naturalmente, nei casi in cui sia possibile dimostrare la trasmissione transovarica, allora tali organismi possono rientrare senza dubbio nel genere *Babesia*. Per quanto molti organismi di cui è disponibile la sequenza del 18S sono stati assegnati al genere semplicemente considerando il fatto che non sono stati ritrovati schizonti nei linfociti, ormai la semplice divisione in base alla grandezza dei piroplasmidi non è più un carattere determinante per la classificazione. Quindi per classificare nuovi piroplasmidi e riclassificare i vecchi occorre in ogni caso affidarsi in modo congiunto ad entrambi i metodi di classificazione.



## Ciclo Biologico

La prima fase del ciclo avviene dopo il pasto di sangue su di un animale infetto da parte del vettore, all'interno dell'intestino della zecca si ha la fase sessuata della riproduzione della babesia (gamogonia). Le babesie si possono rinvenire nella zecca circa 10 ore dopo il pasto di sangue. Tra le 46 e le 60 ore dopo possono ancora ritrovarsi all'interno degli eritrociti ingeriti ma alcune di esse (i gametociti) iniziano a formare dei nuovi organelli, in particolare un organulo a forma di punta di lancia detto *Strahlenkorper* che si ritiene sia coinvolto nella fusione dei gameti. Da quest'ultimo fenomeno si origina lo zigote che successivamente (circa 80 ore dal pasto di sangue) utilizza lo *Strahlenkorper* per attraversare la parete intestinale ed andare verso altri tessuti, dalle cellule epiteliali, in particolare, lo zigote raggiunge le ghiandole salivari attraverso l'emolinfa. La fase successiva, chiamata sporogonia, vede lo sviluppo degli sporozoiti: il parassita inizia ad espandersi fino a coprire tutta la cellula ospite formando uno sporoblasto multinucleato. Al momento del nuovo pasto di sangue, comincia il secondo stadio della sporogonia, nel quale maturano gli organelli del futuro sporozoita. Attraverso un processo di gemmazione, infine, si generano gli sporozoiti che vengono inoculati durante il successivo pasto di sangue (Gelfand and Callahan 2003). Gli sporozoiti sono grandi 2,2 micron per 0,8 micron e presentano una morfologia piriforme, hanno un reticolo endoplasmatico liscio, organelli simili a mitocondri, una roptria anteriore ed alcuni micronemi. Si ritiene che da un singolo sporoblasto possano essere prodotti dai 5000 ai 10000 sporozoiti. Si stima che durante l'ora finale del pasto ematico vengano depositati nel derma adiacente la bocca dell'insetto alcune centinaia di sporozoiti che probabilmente vengono aiutati nel processo infettivo dalla saliva della zecca che si ritiene abbia proprietà antinfiammatorie e/o immunosoppressive (Gelfand and Callahan 2003). E' anche possibile, per alcune specie più grandi delle altre come *B. divergens*, una trasmissione verticale a seguito d'una riproduzione asessuata all'interno dell'ovaio con conseguente infezione congenita delle larve. Lo zigote, adesso denominato oocinete, dopo aver attraversato la parete intestinale, invade altre linee cellulari come quelle adipose o del rene andando incontro ad un ciclo di divisione. Gli oocineti secondari che vengono così prodotti invadono l'ovaio e così possono trasmettersi alla discendenza. Durante il pasto di sangue gli sporozoiti contenuti nelle ghiandole salivari vengono immessi nel sangue dove vanno ad infettare gli eritrociti. Il microorganismo penetra nel globulo rosso tramite un fenomeno d'invaginazione, con formazione d'un vacuolo parassitoforo la cui membrana va incontro a disgregazione con liberazione del parassita piriforme. All'interno dei globuli rossi gli sporozoiti si trasformano

in trofozoi che si dividono per scissione binaria dando origine a dei merozoiti (fino a quattro per volta) che, visti al microscopio ottico, possono assumere varie forme, da quelle ad anello fino a quella d'una croce maltese. (Fig. 2) La formazione dei merozoiti, comunque, può portare alla lisi dell'eritrocita. Alcuni trofozoi, invece, aumentano di dimensioni e, dopo essere stati ingeriti da una nuova zecca, nel suo intestino danno origine a dei gametociti che, una volta usciti dai globuli rossi, si sviluppano a formare dei gameti.

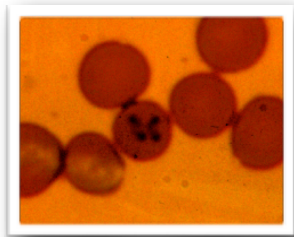


Fig. 2: *Babesia equi*

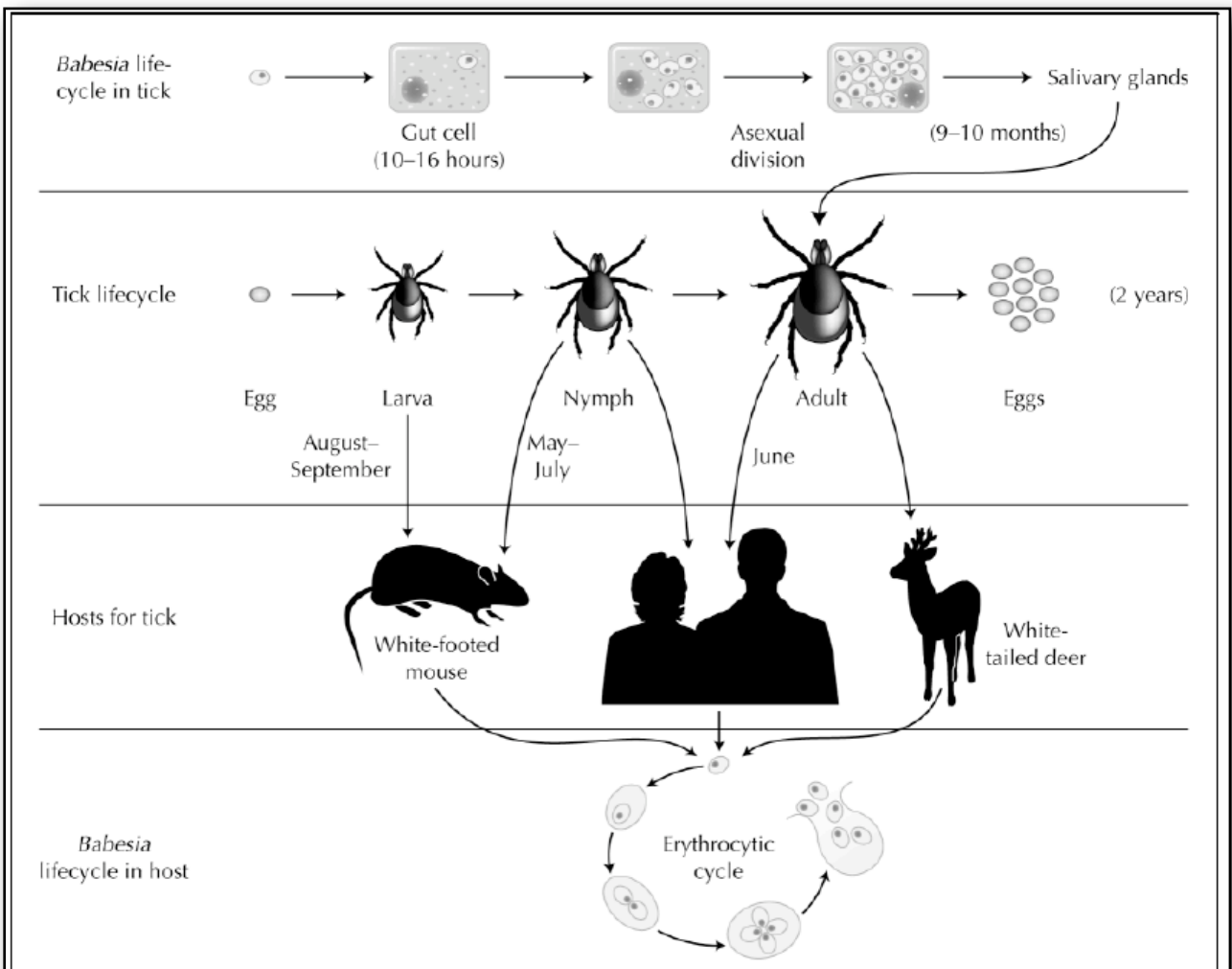


Fig. 3: Ciclo biologico di *Babesia microti* (Gelfand, and Callahan, 2003)

## Patogenesi

La patogenesi dell'infezione da Babesia è da ascrivere principalmente all'anemia di tipo emolitico immuno-mediato. Essa è dovuta solo in parte all'azione diretta dei parassiti sulle cellule ematiche. E' noto, infatti, che la lisi degli eritrociti è opera anche dell'azione degli anticorpi dell'ospite che agiscono sulla superficie dell'emazie a livello soprattutto dei capillari sinusoidi splenici ed epatici. La comparsa in circolo di sferociti attesta la presenza di anemia immuno-mediata e la funzione di "culling" (eritrocateresi) della milza, spesso, si rivela determinante nell'aggravarsi dei sintomi.

Si ritiene, quindi, che l'emolisi (che pare essere, sia intra, che extravascolare) sia solo in parte causata dalla riproduzione del parassita con formazione di merozoiti, e che la gravità della malattia non sia correlata sempre con la parassitemia. (Zintl, Mulcahy et al. 2003)

# Diffusione

La diffusione delle babesiosi si estende praticamente su scala mondiale: comprende in linea di massima tutta la fascia temperata, dove colpisce animali da reddito e animali domestici o d'affezione e si ritrova anche in America del Sud, Africa e Asia, dove però l'impatto può risultare più grave in quanto rappresenta uno dei maggiori problemi a livello di sviluppo zootecnico. (Tab n.1) (Uilenberg 2006)

<i>Babesia</i> species of domestic animals (simplified) <sup>a</sup>			
Species	Domestic host(s)	Vector genus	Distribution
<i>B. beliceri</i>	Cattle	<i>Hyalomma</i>	Russia
<i>B. bigemina</i>	Cattle, buffalo	<i>Boophilus, Rhipicephalus</i>	Africa, America, Asia, Australia, Europe
<i>B. bovis</i>	Cattle, buffalo	<i>Boophilus, Rhipicephalus</i>	Africa, America, Asia, Australia, Europe
<i>B. divergens</i>	Cattle	<i>Ixodes</i>	Europe
<i>B. jakimovi</i>	Cattle, reindeer	<i>Ixodes??</i>	Siberia
<i>B. major</i>	Cattle	<i>Haemaphysalis</i>	Europe
<i>B. occultans</i>	Cattle	<i>Hyalomma</i>	Africa
<i>B. ovata</i>	Cattle	<i>Haemaphysalis</i>	Asia
<i>B. orientalis</i>	Buffalo	<i>Rhipicephalus</i>	Asia
<i>B. crassa</i>	Sheep, goats	Unknown	Asia
<i>B. motasi</i>	Sheep, goats	<i>Haemaphysalis</i>	Africa, Asia, Europe
<i>B. ovis</i>	Sheep, goats	<i>Rhipicephalus</i>	Africa, Asia, Europe
<i>B. caballi</i>	Horse, donkey, mule	<i>Dermacentor, Hyalomma, Rhipicephalus</i>	Africa, America, Asia, Europe
<i>B. perroncitoi</i>	Pig	Unknown	Africa, Europe
<i>B. trautmanni</i>	Pig	<i>Rhipicephalus</i>	Africa, Europe
<i>B. canis</i>	Dog, cat?	<i>Dermacentor</i>	Europe
<i>B. rossi</i>	Dog	<i>Haemaphysalis</i>	Africa
<i>B. vogeli</i>	Dog	<i>Rhipicephalus</i>	Africa, America, Asia, Australia, Europe
<i>Babesia</i> sp. <sup>b</sup>	Dog	?	USA
<i>B. gibsoni</i> and other small piroplasms of dogs <sup>c</sup>	Dog	<i>Haemaphysalis, Rhipicephalus</i>	Africa, America, Asia, Europe
<i>B. (canis) presentii</i>	Cat	Unknown	Asia (Israel)
<i>B. felis</i> <sup>d</sup>	Cat	Unknown	Africa, Europe?

Tab. 1: Diffusione delle specie di *Babesia* negli animali domestici. (Uilenberg, 2006)

Per quel che riguarda invece la diffusione nello specifico di quelle specie che sembrano avere carattere zoonosico (*B. microti*, *B. microti-like*, *B. divergens*) la diffusione conosciuta è al momento legata alle segnalazioni sporadiche riportate in bibliografia e si sovrappone sostanzialmente alla fascia temperata. (Fig. 4)

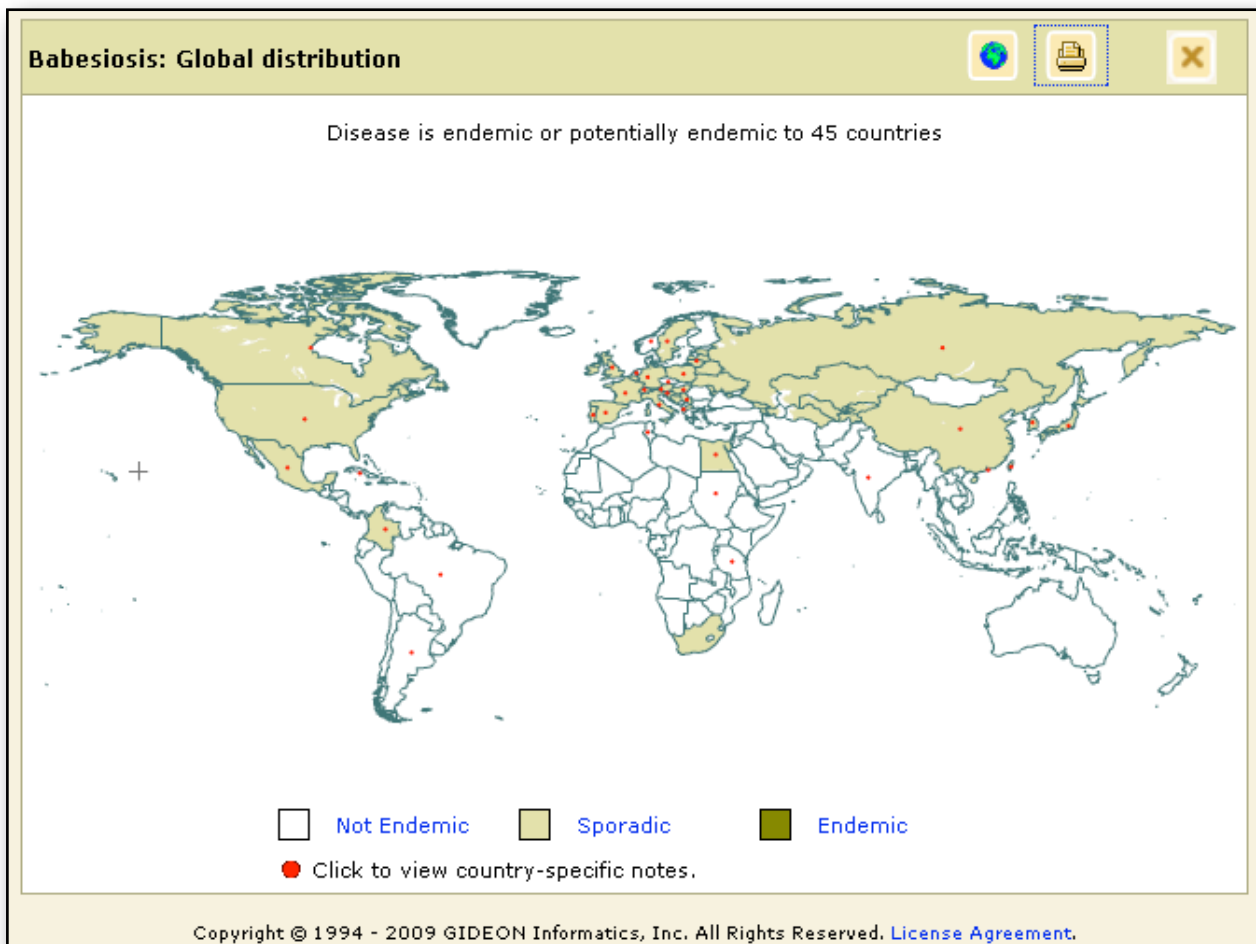


Fig. 4: Distribuzione globale di babesiosi umana (da GIDEON informatics)

Prendendo poi in considerazione le specie di *Babesia* più studiate, solitamente segnalate tra gli animali domestici, si può evidenziare come siano segnalate tra gli ungulati e i carnivori selvatici relativi alla loro controparte domestica. (Tab. 2) (Penzhorn 2006)

<i>Babesia</i> spp. recovered from both domestic animals and wildlife			
Domestic host	<i>Babesia</i> species	Wildlife host	Author(s) and year
Horse	<i>B. caballi</i>	<i>Equus burchelli</i>	Neitz (1965)
		<i>Equus zebra</i>	Zweygarth et al. (2002)
Donkey	<i>B. equi</i> <sup>a</sup>	<i>Equus burchelli</i>	Neitz (1931)
		<i>Equus grevyi</i>	Dennig (1966)
		<i>Equus zebra</i>	Young et al. (1973)
Cattle	<i>B. bigemina</i>	<i>Syncerus caffer</i>	Karbe et al. (1979)
		<i>Bison bison</i>	Zaugg and Kuttler (1987)
		<i>Mazama americana</i>	Clark and Zetek (1925)
		<i>Odocoileus virginianus</i>	Clark and Zetek (1925)
		<i>Gazella soemmeringi</i>	Enigk and Friedhoff (1963a,b)
		<i>Hippotragus niger</i> (?)	Hove et al. (1998)
	<i>B. bovis</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	Levine (1988)
		<i>Cervus elaphus</i>	Levine (1988)
		<i>Odocoileus virginianus</i>	Brumpt (1920)
		<i>Bison bison</i>	Salabarria et al. (1981)
	<i>B. divergens</i>	<i>Ovis musimon</i>	Levine (1988)
		<i>Cervus elaphus</i>	Levine (1988)
		<i>Dama dama</i>	Levine (1988)
<i>Capreolus capreolus</i>		Levine (1988)	
<i>Rangifer tarandus</i>		Nilsson et al. (1965)	
<i>B. major</i>	<i>Bison bison</i>	Findlay and Begg (1977)	
Sheep	<i>B. ovis</i>	<i>Capra pyrenaica</i>	Ferrer et al. (1998a); Marco et al. (2000)
		<i>Ovis musimon</i>	Ferrer et al. (1998a,b)
Dog	<i>B. canis</i>	<i>Canis latrans</i>	Ewing et al. (1964)
		<i>Canis mesomelas</i>	Neitz and Steyn (1947)
		<i>Cyon dukhunensis</i>	Leger and Bédier (1922)
		<i>Nyctereutes procyonides</i>	Levine (1988)
		<i>Lycaon pictus</i>	Neitz (1965)
		<i>Vulpes vulpes</i>	Schoop and Dedić (1938)
	<i>B. gibsoni</i>	<i>Canis aureus</i>	Patton (1910)
		<i>Canis latrans</i>	Evers et al. (2003)
		<i>Fennecus zerda</i>	Maronpot and Guindy (1970)
		<i>Vulpes vulpes</i>	Maronpot and Guindy (1970)
Cat	<i>B. felis</i>	<i>Felis concolor</i>	Carpano (1934)
Pig	<i>B. trautmanni</i>	<i>Potamochoerus porcus</i>	Shone and Philip (1960)
		<i>Phacochoerus aethiopicus</i>	Stewart et al. (1992)
	<i>B. perroncitoi</i>	<i>Sus cristatus</i>	Levine (1988)

Tab. 2: *Babesia* spp segnalate sia nei domestici che nei selvatici

## La diffusione in Italia

La babesiosi è una malattia ben conosciuta in Italia, le prime segnalazioni di babesiosi bovina risalgono al 1895 in Sardegna ad opera di Sanfelice e Loi (Torina and Caracappa 2007) e in seguito molte indagini sono state svolte in questo ambito a causa dell'importanza economica di tale patologia. Al contrario le segnalazioni di babesiosi ovina e caprina sono molto meno documentate, probabilmente anche a causa della minor patogenicità che accompagna queste forme e all'importanza relativa di questo tipo di allevamento in molte regioni italiane. La piroplasmosi equina invece è ben rappresentata in quei cavalli che provengono da zone denominate endemiche e solitamente è causata da *B. equi* e *B. caballi*. La babesiosi canina è ritenuta un problema emergente ormai in tutto il sud Europa.

Considerando le segnalazioni riportate in bibliografia e i dati più recenti (Torina and Caracappa 2007) e andando ad osservarne la distribuzione sul territorio italiano (Fig. 5), si può mettere in evidenza come la presenza di piroplasmici su tutta la penisola sia ben rappresentata. I parassiti più rappresentati, con anche una grande rilevanza economica per gli allevamenti, sono *B. bovis* e *B. bigemina*. Per quel che riguarda invece la piroplasmosi equina, altrettanto ben rappresentata, la specie più diffusa è *B. equi*. Mentre *B. canis* è la specie maggiormente ritrovata nei cani. Per quel che riguarda lo spaccato della fauna selvatica, sono stati ritrovate principalmente *B. bovis* e *B. bigemina* in cervi, volpi e cinghiali. Questi dati però, pur essendo praticamente i più aggiornati a livello di territorio italiano, non bastano a dare un quadro



Fig. 5: Distribuzione sul territorio italiano (Torina e Carappa, 2007)

epidemiologico completo della situazione, soprattutto considerando la totale mancanza di dati in bibliografia per quel che riguarda alcune regioni del Nord Italia.



## Una zoonosi emergente

La prima segnalazione di un'infezione in umana risale al 1908 ad opera di Wilson e Chowing (Wilson and Chowing 1904), i quali segnalano di aver ritrovato dei microorganismi piriformi intraeritrocitari in un campione di sangue umano. Comunque il primo caso definitivo risale al 1957 in un allevatore jugoslavo, inizialmente sospettato di essere affetto da malaria. (Skrabalo and Deanovic 1957) Mentre il primo caso di babesiosi umana riconosciuta risale al 1968 e vede il ricovero in California di un uomo splenectomizzato. (Sholtens, Braff et al. 1968) Da allora, ormai più di 300 casi di babesiosi umana sono stati segnalati negli Stati Uniti, da ascrivere principalmente a *B. microti* (Kjemtrup and Conrad 2000) e probabilmente tali cifre sono sottostimate, dato che molti casi hanno manifestazioni subcliniche e passano probabilmente inosservati. (Krause, Spielman et al. 1998) Considerando la situazione in Europa, al momento sono stati segnalati circa 60 casi, causati per la maggior parte da *B. divergens* (Meliani, Khatibi et al. 2006) Recentemente un organismo responsabile di zoonosi e classificato come *non-Babesia divergens*, denominato EU1, è stato ritrovato in Italia e in Austria. (Herwaldt, Caccio et al. 2003) Questo caso di infezione umana riportata in un cacciatore splenectomizzato, mette in luce come in realtà potrebbe esserci una circolazione di *Babesia* nel comparto umano, anche se silente e forse ristretta a soggetti a rischio. (Pietrobelli, Cancrini et al. 2007)

# Diagnosi Tradizionale

Le tecniche diagnostiche si dividono classicamente in dirette ed indirette. Ciascuna tecnica può avere caratteristiche proprie quali: sensibilità, specificità, riproducibilità, ripetibilità. Tali caratteristiche appaiono indissolubilmente legate alla loro destinazione d'uso ed indirettamente all'approccio diagnostico.

## TECNICHE DIAGNOSTICHE DIRETTE

Sono utilizzate per identificare l'agente eziologico. Naturalmente tra queste ricade l'osservazione diretta del parassita effettuata mediante la ricerca al microscopio ottico negli strisci di sangue. Altre meno utilizzate si basano sull'isolamento dei parassiti mediante coltivazione in brodi e terreni di coltura. Queste tecniche si possono eseguire su campioni di tessuto, secreti e sangue. Ricordiamo a titolo di completezza che anche l'esame istologico può in taluni casi, se eseguito su tessuti emopoietici, (tessuto splenico, midollo ecc.) essere d'ausilio diagnostico.

## OSSERVAZIONE SANGUE PERIFERICO

Per la maggior parte dei casi clinici che arrivano ai laboratori, la tecnica più flessibile e ancora maggiormente usata è la ricerca diretta del parassita in strisci di sangue per mezzo di colorazioni di Romanowsky. (Uilenberg 2004)

La ricerca delle babesie tramite l'osservazione di sangue periferico è volta al riconoscimento del parassita negli eritrociti dell'animale. Essa è facilmente eseguibile per quelle specie di babesie di grandi dimensioni come *B. canis*, mentre risulta di difficile interpretazione in quelle più piccole come *B. equi*. Infatti mentre è relativamente agevole riconoscere i trofozoiti nelle forme più grandi (ad anello con nuclei periferici ben colorati o piriformi), che possono essere singole o in coppia; nelle forme di minori dimensioni solo in rari casi è possibile formulare una diagnosi sicura, cioè nella fortunata probabilità di mettere in evidenza quattro merozoiti all'interno d'un globulo rosso uniti dall'apice in senso verticale ed orizzontale (configurazione a croce maltese).

A volte nei casi di forte parassitemia si possono rinvenire in associazione ad altre forme anche trofozoiti esternamente agli eritrociti. Si possono anche notare, ma con molta difficoltà, forme filamentose od amorfe in corrispondenza del picco della parassitemia o del suo declino ed esse vengono considerate come forme degenerative (o forme di crisi).

Nei bovini *B. divergens* può dare forme particolari dovute al fatto che i merozoiti tendono a localizzarsi alla periferia causando una lieve protrusione della membrana eritrocitaria. I parassiti risultano individuabili su sangue periferico per un tempo che va dalle tre alle dodici settimane. I limiti della diagnosi al microscopio ottico sono dati dall'esperienza ed abilità dell'operatore, essendo una metodica che lascia molto spazio all'interpretazione da parte dell'operatore, e dal livello della parassitemia, dove in caso di parassitemia bassa si potrebbe andare incontro ad un esito falso negativo. Un altro elemento da tenere in considerazione è la capacità di distinguere i diversi sottotipi morfologici e sicuramente rientra in questo l'esperienza del singolo operatore. (Comazzi, Pieralisi et al. 2004)

In medicina umana le forme anulari, potrebbero confondersi con quelle del *Plasmodium falciparum*; la diagnosi differenziale può essere fatta individuando i pigmenti di emozoina che nelle babesie mancano (tenendo da conto, comunque, che plasmodi giovani possono difettare di tale pigmento). La diagnosi differenziale in medicina umana deve essere fatta perciò nei confronti della malaria in quanto una diagnosi errata può ritardare un trattamento specifico il che potrebbe risultare assai pericoloso (Vannier and Krause 2009). L'esame viene effettuato sia con la tecnica dello striscio sottile, che con quella della goccia spessa. La prima tecnica consiste nella realizzazione di un sottile strato di eritrociti su un vetrino portaoggetti che viene successivamente strisciato, fissato e colorato.

Questa tecnica si differenzia da quella "a goccia spessa" in quanto quest'ultima si prepara deponendo una piccola goccia (10-25µl) di sangue al centro di un vetrino portaoggetti e successivamente ruotando con l'angolo di un vetrino la goccia per 1-2 minuti la si allargarla su una superficie di 1-1,5 cm<sup>2</sup>. Il preparato, quindi viene lasciato asciugare a temperatura ambiente per 1-2 ore, o meglio, per 18-24 ore.

Le colorazioni che possono essere utilizzate per l'osservazione delle babesie su sangue periferico sono principalmente quelle di Romanosky e quelle che utilizzano coloranti sopravitali. Nelle prime, che prevedono la fissazione dei preparati, si utilizzano due coloranti, uno acido che si fissa alle componenti basiche (citoplasma) ed uno basico che si fissa alle componenti acide della cellula (acidi nucleici e nucleoproteine). (Comazzi, Pieralisi et al. 2004)

I tipi di colorazioni di Romanosky che si usano più frequentemente sono: Diff Quick (Dade Spa - Milano) molto rapida, permette una buona differenziazione degli elementi cellulari; May Grunwald - Giemsa utilizzata solo per preparati a striscio sottile, richiede 30' ma è utile per la differenziazione degli elementi cellulari.

Tra le colorazioni sopravitali ricordiamo quella del Nuovo Blu di Metilene che permette di evidenziare i residui cromatinici nei reticolociti (eritrociti immaturi non nucleati).

## LETTURA MICROSCOPICA

L'esame al microscopio dello striscio di sangue viene eseguito in due tempi:

prima si osserva il vetrino a piccolo ingrandimento per valutare la qualità dello striscio, la distribuzione cellulare e la presenza di aggregati piastrinici. Quindi viene scelta una zona dove gli eritrociti formano uno strato uniforme e si passa all'osservazione a forte ingrandimento, procedendo con la tecnica della greca in modo tale da osservare sia il bordo del preparato sia alcune zone centrali.

Prima di ritenere negativo un preparato a striscio sottile è consigliabile osservare almeno 200-400 campioni, invece in un preparato a goccia spessa è consigliabile osservare almeno 100 campioni contenenti circa 20 leucociti caduno (AA.VV. 1993)

Tra le tecniche utilizzate per l'osservazione di campioni di sangue periferico, che vertono alla ricerca del parassita possiamo ancora citare alcune particolari colorazioni, utilizzabili sia con tecnica di goccia spessa, che in strato sottile. Queste sono rappresentate dalla colorazione DAPI e dalla colorazione all'Ocridina Orange. Entrambe queste colorazioni si basano sull'uso di sostanze fluorescenti che rendono visibili i parassiti. (Comazzi, Paltrinieri et al. 1999)

## **TECNICHE DIAGNOSTICHE INDIRECTE**

Queste tecniche dimostrano l'avvenuto contatto con l'agente mediante la ricerca della presenza di anticorpi specifici. Sono analisi sierologiche e presentano diversi vantaggi: sono eseguibili su vasta scala, sono applicabili su un numero elevato di campioni e su banche di siero e possono descrivere "la storia" dell'agente all'interno della popolazione.

## **TECNICA IMMUNOFLUORESCENZA INDIRECTA**

La tecnica di immunofluorescenza indiretta a scopo diagnostico si è sviluppata intorno al 1965, con successive evoluzioni nel corso del ventennio successivo. E' un metodo molto usato per le sue caratteristiche di sensibilità, specificità di reazione, riproducibilità e facilità di esecuzione. La tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) prevede che il tessuto o le cellule, con l'eventuale antigene, siano adesi ad un vetrino porta-oggetti. Il siero del paziente, opportunamente diluito, viene versato a coprire il substrato contenente gli antigeni e lasciato reagire a temperatura ambientale per alcuni minuti. Successivamente i

preparati vengono ricoperti con un sottile film di un antisiero coniugato ad una sostanza fluorescente. (Bakheit, Seitzer et al. 2007)

Tale tecnica diagnostica presenta alcuni limiti quali, primo fra tutti, la necessità di personale tecnico esperto per la preparazione dei substrati e la dotazione di apparecchiature abbastanza costose quali il microscopio a fluorescenza. È una tecnica comunque legata ad un certo grado di soggettività dell'operatore al microscopio che determina il risultato. L'immunofluorescenza indiretta è una metodica usata per evidenziare varie specie di babesie, con una buona sensibilità (88-96%) e specificità (90-100%). La metodica risulta essere sensibile e specifica, utile nell'individuazione delle forme croniche di babesiosi, ma non sempre sufficiente per formulare una diagnosi.

Un altro punto limitante è dato dal fatto che gli anticorpi si sviluppano solamente in una fase tardiva dell'infezione ed in effetti la metodica ad immunofluorescenza indiretta viene riservata, come controllo, a casi in cui la diagnosi di babesiosi sia già stata posta. Ma forse il maggiore problema per l'utilizzo routinario di tale tecnica rimane la possibilità che altre parassitosi od alcune patologie possano dare reazioni crociate generando dei falsi positivi.

## **FISSAZIONE DEL COMPLEMENTO**

Il sistema del complemento, insieme con gli anticorpi, rappresenta l'elemento essenziale dei meccanismi di difesa umorali contro gli agenti infettivi. Esso non è costituito da un anticorpo ma da una serie di enzimi, presenti nel siero, che attaccano gli agenti patogeni, causando la lisi o perdita di costituenti cellulari attraverso un danneggiamento della membrana cellulare. Questi enzimi sono normalmente inattivi e si attivano quando avviene una reazione antigene-anticorpo.

Il complemento partecipa a diverse reazioni, tra cui:

- la lisi batterica, che si ha quando anticorpi specifici si combinano con gli antigeni sulle cellule batteriche in presenza del complemento
  - fagocitosi, avviene quando un anticorpo specifico si combina con una cellula in presenza del complemento, la cellula si modifica in modo tale che possa avvenire la fagocitosi.
- L'attivazione del complemento avviene soltanto con anticorpi delle classi IgG e IgM. Quando tali anticorpi si combinano con i rispettivi antigeni, presenti sulla superficie cellulare, il dominio costante della molecola assume una conformazione particolare, che gli consente di fissarsi alle proteine del complemento, che sono sempre presenti nella circolazione. Il sistema del complemento agisce con una cascata di eventi: l'attivazione di un componente ha, infatti, come risultato l'attivazione del successivo.

La lisi e la morte della cellula consiste nella formazione di pori sulla membrana cellulare, attraverso i quali la cellula perde il proprio citoplasma.

La reazione sierologica di fissazione del complemento è una tecnica che sfrutta l'attività del complemento presente nel siero. Al siero del paziente si aggiunge dapprima il complemento ed in seguito un sistema rivelatore, costituito di solito da eritrociti di pecora e da anticorpi contro gli eritrociti stessi. Se nel siero si trova l'antigene, il complemento si fissa a questo e non al sistema rivelatore, che rimane inalterato; nel caso contrario il complemento, trovandosi ancora libero, si lega al sistema rivelatore e ne provoca l'emolisi. Quindi il test è positivo in assenza di emolisi (gli eritrociti del sistema rivelatore si depositano sul fondo della provetta lasciando vedere il surnatante limpido) ed è negativo se avviene la reazione emolitica.

Alla fissazione del complemento vengono oggi preferiti test più specifici, poiché presenta il rischio di falsi positivi, in quanto il complemento reagisce con qualsiasi complesso immune, diventa perciò indispensabile avere sempre degli antigeni di controllo, per avere la certezza della diagnosi.

### **ELISA INDIRETTA (Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay)**

Questa tecnica viene usata per rilevare gli anticorpi presenti nel siero dell'animale o dell'uomo. L'attaccamento covalente degli enzimi agli anticorpi crea uno strumento immunologico ad alta specificità e sensibilità. È un metodo che fa uso di anticorpi a cui sono stati covalentemente legati enzimi, in modo che le proprietà catalitiche dell'enzima e la specificità degli anticorpi siano inalterate.

I pozzetti della piastra di microtitolazione, in questo caso, sono coperti con l'antigene e viene aggiunto un campione di siero. Se nel siero sono presenti gli anticorpi per l'antigene, essi si legheranno all'antigene presente nei pozzetti. L'aggiunta del secondo anticorpo anti-IgG, coniugato con un enzima e la successiva aggiunta del substrato enzimatico porta alla precipitazione del substrato con il cambiamento di colore del pozzetto; la quantità di anticorpo per uno specifico antigene sarà proporzionale all'intensità del colore della reazione. I vantaggi dei saggi ELISA sono diversi: non richiedono macchinari costosi, non producono scorie radioattive e sono molto sensibili, motivi per i quali sono largamente usati nei laboratori clinici. La specificità, la rapidità e l'economicità dei saggi ELISA hanno assicurato un vasto uso di questo metodo nella medicina clinica e veterinaria. (Krause, McKay et al. 2002)

I test diagnostici a carattere sierologico sono largamente accettati come strumenti di screening e sorveglianza per la loro grande flessibilità, soprattutto ora che la possibilità di produrre proteine ricombinanti ha risolto in parte i limiti di cross-reattività che venivano riscontrati con l'uso di preparati antigenici prodotti dal parassita in toto. (Bakheit, Seitzer et al. 2007)

# Nuove diagnosi con metodi di biologia molecolare

Negli ultimi venti anni si è assistito, in praticamente tutti i campi di ricerca, ad un enorme sviluppo e impiego di metodologie a carattere biomolecolare, con un incremento di sensibilità e specificità del processo di indagine sperimentale. Per quel che riguarda i metodi di biologia molecolare, l'uso del DNA come campione biologico nei test a carattere diagnostico, ha l'indiscusso vantaggio che tale molecola rimane costante per tutto il ciclo vitale del parassita, al contrario di molecole come l'RNA che viene trascritto o meno sotto l'influenza di diversi fattori biologici o esterni.

La prima applicazione della PCR per la diagnosi di babesiosi risale al 1992 (Fahrimal, Goff et al. 1992) e da allora sono stati pubblicati più di 200 articoli riguardanti la ricerca tramite PCR di piroplasmi.

## Standard PCR

L'applicazione della PCR prevede la possibilità di amplificare un frammento bersaglio di DNA, utilizzando contemporaneamente coppie di oligonucleotidi di sintesi, specifici per una data regione, e le caratteristiche delle polimerasi termostabili di operare ad alte temperature senza essere denaturate. (Saiki, Gelfand et al. 1988) In questo modo partendo anche da quantità minime di DNA bersaglio si può, attraverso una corsa elettroforetica su gel, evidenziare la presenza o meno del DNA target nel nostro campione di partenza. L'introduzione della tecnica della PCR e la sua alta sensibilità per l'identificazione di organismi infettivi ha portato ad un gran numero di applicazioni in questa direzione di tale tecnica.

La maggior parte delle PCR messe a punto e utilizzate in lavoro scientifici mostrano come uno dei geni maggiormente utilizzati sia quello del 18S. (Criado-Fornelio 2007) Tuttavia il gene 18S rRNA è presente in poche copie nel genoma di *Babesia*, con solo 2 o 3 ripetizioni. (Dalrymple 1990) (Kibe, ole-MoiYoi et al. 1994) Il numero di copie del gene bersaglio ha sicuramente un impatto nella sensibilità della diagnosi molecolare, ma in questo caso la scelta era limitata dal numero relativamente basso di sequenze presenti in database e di conseguenza le alternative fino ad ora sono risultate scarse. (Criado-Fornelio 2007) Di fatto comunque i dati riportati nella maggior parte dei lavori più recenti



indicano in ogni caso una maggior sensibilità di tale tecnica rispetto a tecniche di tipo tradizionale. (Costa-Junior, Rabelo et al. 2006)

## **Reverse line blotting**

Questo metodo di diagnosi molecolare combina la PCR con l'ibridazione degli amplificati con una o più sonde oligonucleotidiche presenti su una membrana di supporto, per questo motivo prende il nome di Reverse Line Blotting (RLB). (Tait and Oura 2004) Solitamente la membrana porta diverse sonde, combinando in questo modo le specie ben conosciute e eventualmente nuovi isolati. Questo approccio ha la possibilità di analizzare campioni multipli con sonde multiple presentando il grande vantaggio di poter consentire l'identificazione simultanea di diversi patogeni. (Gubbels, de Vos et al. 1999)

Originariamente è stata sviluppata per l'identificazione dei sierotipi di *Streptococci* da Kaufhold et al. (Kaufhold, Podbielski et al. 1994) e la prima applicazione del RLB per l'identificazione e la differenziazione di patogeni presenti in zecche è stata sviluppata per *Borrelia*. (Rijpkema, Molkenboer et al. 1995) Successivamente Gubbels et al. (1999) svilupparono il primo test per individuare e differenziare tutte le specie di *Theileria* e *Babesia* al momento conosciute. RLB è diventata in breve tempo uno dei test biomolecolari standard per la diagnosi e gli studi di carattere epidemiologico in un crescente numero di laboratorio internazionali: è stata impiegata per la caratterizzazione di *Babesia divergens* in alcuni casi umani (Centeno-Lima, do Rosario et al. 2003), è stata anche utilizzata per segnalare numerose *Babesia spp* e *Theileria spp* in piccoli ruminanti (Schnittger, Yin et al. 2004), fino all'applicazione per lo studio di protozoi emoparassitari in Uganda e Portogallo. (Oura, Bishop et al. 2004) (Brigido, da Fonseca et al. 2004)

Il primo passaggio prevede l'amplificazione tramite PCR di una regione variabile del gene ribosomiale 18S, utilizzando una coppia di primer disegnati nella parte conservata del gene. I primer naturalmente sono specifici per l'amplificazione del gene dell'organismo target e non sono complementari all'ospite o al vettore, in modo da avere un'alta specificità della reazione di amplificazione. Il secondo passaggio prevede l'ibridazione dei prodotti di amplificazione su di una membrana su cui sono adese covalentemente le sonde specie-specifiche, disegnate nella regione ipervariabile del gene amplificato. I prodotti di PCR sono blottati perpendicolarmente in modo che, dopo un'incubazione della membrana con un sistema di rilevazione in chemiluminescenza e lo sviluppo della

relativa lastra fotografica, si ha la comparsa di singoli spot dove è avvenuta l'ibridazione e viene così identificato il piroplasma eventualmente presente. (Fig.6 e 7)

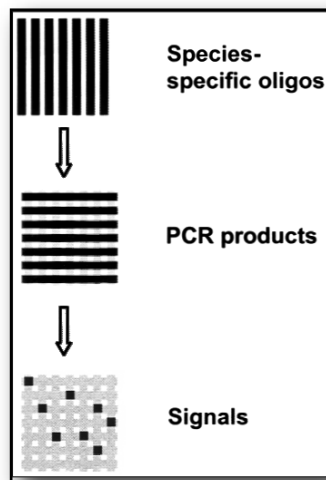


Fig. 6: Schema di Reverse Line Blot

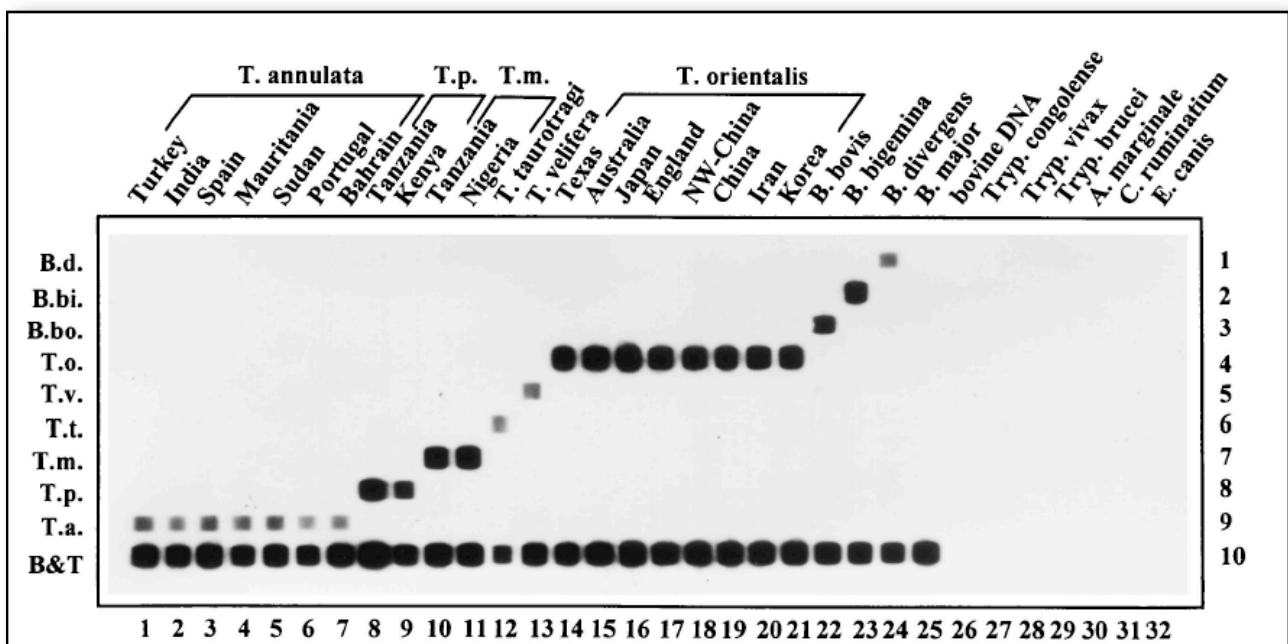


Fig. 7: Risultato di una reazione su film fotografico (Gubbels et al., 1999)

## Real Time PCR

La real time PCR si basa sulla rilevazione della fluorescenza prodotta da una molecola reporter, tale fluorescenza aumenta col procedere della reazione in caso di amplificazione, con l'accumulo del prodotto di PCR. Si utilizzano diversi tipi di molecole fluorescenti, quali coloranti che legano la doppia elica (SYBR® Green) o sonde specifiche per la sequenza amplificata. (sonde TaqMan® o FRET®)

Questa tecnica permette di monitorare la reazione in tempo reale e inoltre, poichè i dati sono raccolti durante la reazione, non è necessaria nessuna manipolazione post amplificazione dei campioni, eliminando il rischio di contaminazione. Probabilmente dato che il prezzo dei ciclizzatori e dei reagenti è ancora elevato, il numero di pubblicazioni che tratta di real time PCR per le piroplosi è ancora basso. (Criado-Fornelio 2007)



# Contributo Sperimentale

## Obiettivo del lavoro

Il presente lavoro ha visto lo sviluppo e la messa a punto di metodi diagnostici per il rilevamento e l'identificazione a livello di specie attraverso l'impiego di tecniche di biologia molecolare, PCR standard e real time, dei piroplasmi appartenenti a *Babesia* spp, in particolare: *B. equi*, *B. caballi*, *B. canis*, *B. bovis*, *B. bigemina* e *B. divergens*, da matrici semplici di origine animale, quali prelievi di sangue venoso o autoptici. Inoltre comprende l'applicazione di tali metodiche allo studio dell'epidemiologia dell'infestazione da *Babesia* in specie domestiche (canidi, equini, bovini) e selvatiche (ungulati) in zone mai o scarsamente indagate in precedenza.

## Organizzazione del lavoro

L'obiettivo complessivo del progetto è pertanto quello di verificare la diffusione delle babesiosi nelle diverse specie animali nelle aree indagate e di valutare il rischio di trasmissione della malattia all'uomo.

Tale obiettivo può essere schematizzato nei seguenti stadi:

1. verificare la presenza e la diffusione di *Babesia spp.* in animali domestici e selvatici in aree mai o scarsamente indagate in precedenza;
2. identificare eventuali reservoirs selvatici del parassita soprattutto negli habitat nei quali è frequente la sovrapposizione tra animali selvatici, animali domestici e uomo;
3. identificare e tipizzare le specie di *Babesia* isolate dalle diverse specie animali, mediante l'utilizzo di tecniche biomolecolari che possano chiarire l'origine di eventuali ceppi umani;
4. verificare il reale rischio per la salute pubblica ed identificare i fattori di rischio associati.

# Materiali e Metodi

## Campioni

Nell'arco del progetto si è deciso di procedere con la raccolta di campioni provenienti da animali da reddito e da compagnia appartenenti principalmente al territorio della regione Piemonte. Per quel che riguarda gli animali da reddito, di compagnia o d'affezione, sono stati prelevati sia animali che presentavano una sintomatologia compatibile con la presenza della malattia sia animali sani.

Sono stati raccolti 169 campioni prelevati da cavalli provenienti da diversi maneggi e scuderie della provincia di Torino in cui in precedenza erano già state eseguite delle diagnosi di babesiosi. Per 40 animali è stato effettuato un prelievo in doppio: oltre al sangue intero posto in provette con anticoagulante, si è proceduto con il prelievo di un'aliquota di sangue intero posto però in provette senza anticoagulante.

Sono stati inoltre raccolti 55 campioni di sangue intero prelevati da cani provenienti dal Canavese (Ciriè e comuni limitrofi). Per ogni cane è stata compilata una scheda in cui veniva segnalata la presenza o assenza di sintomatologia e l'eventuale contatto del cane con il vettore della babesiosi.

Sono stati raccolti 35 campioni di sangue intero da bovini provenienti da due allevamenti in provincia di Cuneo (Ceva e Caramagna), in uno dei quali era stata riscontrata una sintomatologia conclamata per babesiosi bovina e i capi normalmente venivano portati al pascolo, mentre nell'altro non era presenti animali con storie pregresse di babesiosi e gli animali sono allevati esclusivamente in stalla.

Per quel che riguarda il campionamento legato alla fauna selvatica, sono stati processati i prelievi autoptici di tessuto splenico effettuati da caprioli (134), cinghiali (99), daini (16), camosci (11), cervi (8) che arrivavano al Settore di Parassitologia dal piano della regione Piemonte di "Contenimento e Smaltimento degli animali selvatici", a parte un limitato

numero di cinghiali (12) provenienti dall'Isola d'Elba. In tabella sono riportate le differenti provenienze delle rispettive specie animali di appartenenza.

<b>Provenienza</b>	<b>Specie</b>				
	Capriolo	Cinghiale	Daino	Camoscio	Cervo
Provincia TO	66	32		11	8
Provincia AL	32	40	16		
Provincia CN	36				
Provincia NO		15			
Isola d'Elba		12			

## Estrazione del DNA

Prima di sottoporre i campioni all'amplificazione viene operata, tramite il kit GenomeElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep prodotto dalla Sigma-Aldrich, l'estrazione dell'intero DNA. Il passaggio è obbligato dovendo andare ad amplificare i campioni tramite la PCR, poiché occorre eliminare tutti i possibili inibitori della polimerasi. Il kit utilizza delle colonnine di silice, eliminando così sia l'uso di resine più costose, sia procedure meno standardizzabili e più pericolose come le precipitazioni con fenolo e cloroformio. La matrice di partenza, che può essere sia sangue intero che tessuto, viene inizialmente lisata con una soluzione di sali chaotropici e proteinasi K, per ottenere la denaturazione delle macromolecole. Quindi l'aggiunta di etanolo porta al legame del DNA presente nel campione alla membrana della colonnina dopo la centrifugazione, dopo una serie di lavaggio per rimuovere eventuali contaminati, il DNA, eluito con Tris-EDTA, può essere utilizzato direttamente per le applicazioni successive. (Fig. 8)

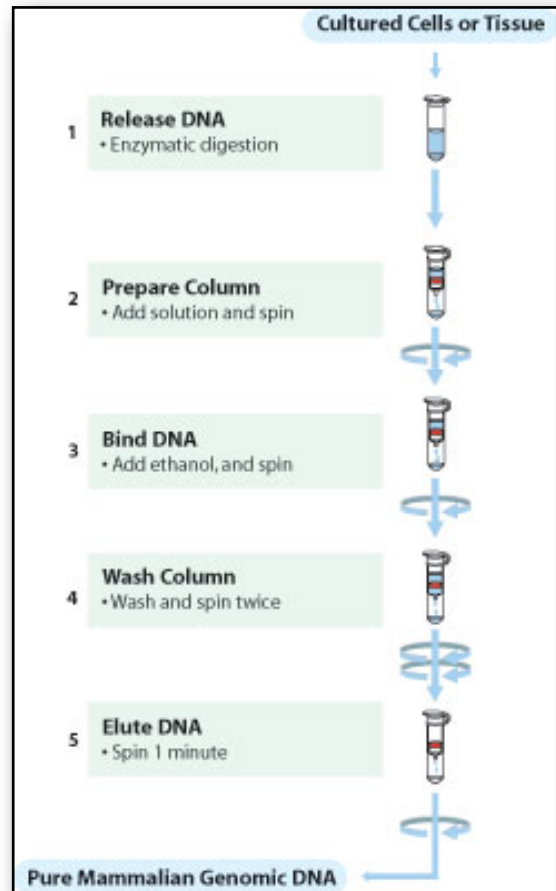


Fig. 8: GenomeElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep

### Estrazione del DNA da sangue coagulato

Per alcuni campioni è stata eseguita un'estrazione di DNA in doppio, dopo aver prelevato dall'animale il sangue intero in provetta con anticoagulante, è stato eseguito un secondo prelievo, questa volta in provetta senza anticoagulante. I coaguli così prelevati, sono stati sottoposti ad estrazione prelevandone un'aliquota di circa 25 mg e processati come tessuti.



## PCR specie specifica

### *Babesia equi-Babesia caballi*

Per lo screening biomolecolare dei campioni di sangue e coaguli provenienti da cavalli è stato utilizzato il protocollo di PCR messo a punto da Alhassan et al. (Alhassan, Pumidonming et al. 2005)

Questo protocollo è una multiplex PCR, in quanto prevede la possibilità di amplificare contemporaneamente il DNA di *B. equi* e *B. caballi*, utilizzando due primer reverse specie-specifici: Equi-R (5'-TGCCTTAAACTTCCTTGCGAT-3') e Cab-R (5'-CTCGTTCATGATTTAGAATTGCT-3'), rispettivamente per *B. equi* e *B. caballi*, accoppiati al primer forward comune: Bec-U2 (5'-TCGAAGACGATCAGATACCGTCG-3').

Il prodotto che viene amplificato è un frammento di 392 bp per *B. equi* e 540 bp per *B. caballi*.

Le quantità della mix per 1 reazione di amplificazione sono (volume totale: 50 µl):

Reagente	Volume
Primer Equi-R	0,5 µl
Primer Cab-R	0,5 µl
Primer Bec-U2	0,5 µl
AmpliGold Taq MM™	25 µl
DNA	3 µl
Acqua	18,5 µl

I cicli della reazione di PCR prevedono 3 stadi:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 40 volte)	95° C per 1' 60,5° C per 1' 72° C per 1'
Stadio 3	72° C per 10' 4° C

Il prodotto di PCR viene separato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% contenente GelRed™ (Biotium), 1 µl ogni ml di soluzione, per la rilevazione selettiva del DNA su lampada UV.

## ***Babesia canis***

Per lo screening biomolecolare dei campioni di sangue prelevati da cani è stato utilizzato il protocollo di nested PCR per lo screening delle piroplasmosi nel cane. (Birkenheuer, Levy et al. 2003)

Questo protocollo di PCR prevede una prima amplificazione di quasi la totalità del gene 18S, circa 1,7 kb, di tutte le specie di babesia, utilizzando i primer 5-22F (5'-GTTGATCCTGCCAGTAGT-3') e 1661R (5'-AACCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC-3'), seguita poi da una seconda amplificazione con i primer BCC-F (5'-TGCGTTGACGGTTTGACC-3') e 793-771R (5'-ATGCCCCCAACCGTTCCTATTA-3') che vanno ad amplificare una regione ipervariabile interna del 18S per poter quindi identificare la specie di babesia eventualmente presente nel campione.

Il prodotto che viene amplificato al termine della seconda PCR é un frammento di circa 340 bp.

Le quantità della mix per 1 reazione di amplificazione sono (volume totale: 50 µl):

### Prima PCR 18S

Reagente	Volume
Primer 5-22F	1 µl
Primer 1661R	1 µl
AmpliGold Taq MM™	25 µl
DNA	2 µl
Acqua	21 µl

### Seconda PCR *B. canis*

Reagente	Volume
Primer BCC-F	1 µl
Primer 793-771R	1 µl
AmpliGold Taq MM™	25 µl
Prodotto prima PCR	1 µl
Acqua	22 µl

I cicli della reazione della prima PCR 18S prevedono 3 stadi:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 35 volte)	95° C per 1'
	56° C per 1'
	72° C per 1'
Stadio 3	72° C per 10'
	4° C

I cicli della reazione della seconda PCR *B. canis* prevedono 3 stadi:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 40 volte)	95° C per 45" 58° C per 45" 72° C per 45"
Stadio 3	72° C per 10' 4° C

Il prodotto di PCR viene separato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% contenente GelRed™ (Biotium) per la rilevazione selettiva del DNA su lampada UV.

## PCR catch all

Per tutti i campioni è stata eseguita anche la PCR catch all, in grado di amplificare un frammento denominato regione V4 del gene 18S. La PCR, tratta dal protocollo per la Reverse Line Blot (Bekker, de Vos et al. 2002), sfrutta l'alta conservazione, anche tra specie diverse di Babesia, delle regioni esterne di questo gene per poter amplificare tutti gli eventuali piroplasmici presenti nel campione. Viene quindi usato il set di primer RLB-F2 (5' - G A C A C A G G G A G G T A G T G A C A A G - 3') e RLB-R2 (5' - C T A A G A A T T T C A C C T C T G A C A G T - 3') per amplificare un frammento di circa 400 bp.

Le quantità della mix per 1 reazione di amplificazione sono (volume totale: 50 µl):

Reagente	Volume
Primer RLB-F2	1 µl
Primer RLB-R2	1 µl
AmpliGold Taq MM™	25 µl
DNA	5 µl
Acqua	18 µl

I cicli della reazione di PCR prevedono 3 stadi:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 40 volte)	95° C per 1' 50° C per 1' 72° C per 1.5'
Stadio 3	72° C per 10' 4° C

Il prodotto di PCR viene separato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% contenente GelRed™ (Biotium), 1 µl ogni ml di soluzione, per la rilevazione selettiva del DNA su lampada UV.

## PCR seminested catch all

Per quei campioni di cui si è deciso di procedere col sequenziamento è stata eseguita una PCR seminested per aumentare la quantità del prodotto amplificato da inviare al sequenziamento. Il protocollo utilizzato prevede la riamplicazione del prodotto di una prima reazione ottenuta utilizzando gli stessi primer della PCR catch all, con una seconda amplificazione che viene eseguita sostituendo il precedente primer forward con un primer più interno denominato RLB-Fint (5'-GACAAGAAATAACAATACRGGGC-3'). (Schnittger, Yin et al. 2004)

Le quantità della mix per 1 reazione di amplificazione sono (volume totale: 25 µl):

Prima PCR	
Reagente	Volume
Primer RLB-F2	1 µl
Primer RLB-R2	1 µl
AmpliGold Taq MM™	12,5 µl
DNA	5 µl
Acqua	5,5 µl

Seconda PCR	
Reagente	Volume
RLB-Fint	1 µl
Primer RLB-R2	1 µl
AmpliGold Taq MM™	12,5 µl
DNA	1 µl
Acqua	9,5 µl

I cicli della reazione della prima PCR prevedono 3 stadi:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 10 volte)	95° C per 30" 50° C per 45" 72° C per 1'
Stadio 3	72° C per 10' 4° C

I cicli della reazione della seconda PCR prevedono 3 stadi:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 40 volte)	95° C per 30" 55° C per 45" 72° C per 45"

Stadio 3

72° C per 10'  
4° C

Il prodotto di PCR viene separato mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% contenente GelRed™ (Biotium), 1 µl ogni ml di soluzione, per la rilevazione selettiva del DNA su lampada UV.

## Reverse Line Blot

È stato utilizzato, grazie alla collaborazione con il settore di Malattie Infettive, il kit Tick Borne Disease Reverse Line Blot (TBD-RLB kit) della ISOGEN per confermare le positività ritrovate in PCR standard e avere un'identificazione a livello di specie dei piroplasmi presenti.

Il kit consta di due fasi: la prima in cui si va ad amplificare con una PCR touchdown che utilizza i primer RLB-F2 (5'-GACACAGGGAGGTAGTGACAAG-3') e RLB-R2 (5'-**Biotin**-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3') forniti con il kit e una seconda fase di ibridazione con la membrana su cui sono adese le sonde specie-specifiche.

Inoltre sono anche forniti i relativi plasmidi da ibridizzare sulla membrana per essere utilizzati come controlli positivi.

Le quantità della mix per 1 reazione di amplificazione sono (volume totale: 25 µl):

Reagente	Volume
Primer RLB-F2	0,25 µl
Primer RLB-R2	0,25 µl
AmpliGold Taq MM™	12,5 µl
DNA	2,5 µl
Acqua	9,5 µl

I cicli della reazione di PCR touchdown prevedono:

Stadio 1	95° C per 10'
Stadio 2 (ripetuto 2 volte)	95° C per 20" 67° C per 30" 72° C per 30"
Stadio 3 (ripetuto 2 volte)	95° C per 20" 65° C per 30" 72° C per 30"
Stadio 4 (ripetuto 2 volte)	95° C per 20" 63° C per 30" 72° C per 30"
Stadio 5 (ripetuto 2 volte)	95° C per 20" 61° C per 30" 72° C per 30"
Stadio 6 (ripetuto 2 volte)	95° C per 20" 59° C per 30"

Stadio 7 (ripetuto 40 volte)	72° C per 30"
	95° C per 20"
	57° C per 30"
Stadio 8	72° C per 30"
	72° C per 10'
	4°

La membrana da noi utilizzata è ibridizzata con le seguenti sonde:

Lane	Specie	Lane	Specie
1	<i>Ehrlichia/Anaplasma catch-all</i>	19	<i>Babesia rossi</i>
2	<i>Anaplasma centrale</i>	20	<i>Babesia canis canis</i>
3	<i>Anaplasma marginale</i>	21	<i>Babesia canis vogeli</i>
4	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	22	<i>Babesia major</i>
5	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	23	<i>Babesia bicornis</i>
6	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	24	<i>Babesia caballi</i>
7	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	25	<i>Theileria sp Kudu</i>
8	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	26	<i>Theileria sp Sable</i>
9	<i>Anaplasma bovis</i>	27	<i>Theileria bicornis</i>
10	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	28	<i>Theileria annulata</i>
11	<i>Ehrlichia sp Omatjenne</i>	29	<i>Theileria bufferi</i>
12	<i>Ehrlichia canis</i>	30	<i>Theileria sp Buffalo</i>
13	<i>Theileria/Babesia catch-all</i>	31	<i>Theileria mutans</i>
14	<i>Babesia felis</i>	32	<i>Theileria parva</i>
15	<i>Babesia divergens</i>	33	<i>Theileria taurotragi</i>
16	<i>Babesia microti</i>	34	<i>Theileria velifera</i>
17	<i>Babesia bigemina</i>	35	<i>Theileria equi</i>
18	<i>Babesia bovis</i>	36	<i>Theileria lestoquardi</i>



Sulla membrana vengono blottati i prodotti di PCR, dopo essere stati denaturati a 100° per 10 minuti in modo da ottenere le singole eliche svolte, dopo un'ora di incubazione e una serie di lavaggi, necessari a eliminare l'eccesso di amplificato, viene aggiunto il coniugato con streptavidina e, dopo un periodo di incubazione e due lavaggi per eliminarne l'eccesso, viene aggiunta la soluzione ECL (Amersham Bioscience) e si procede con lo sviluppo della lastra fotografica. (Fig. 9)

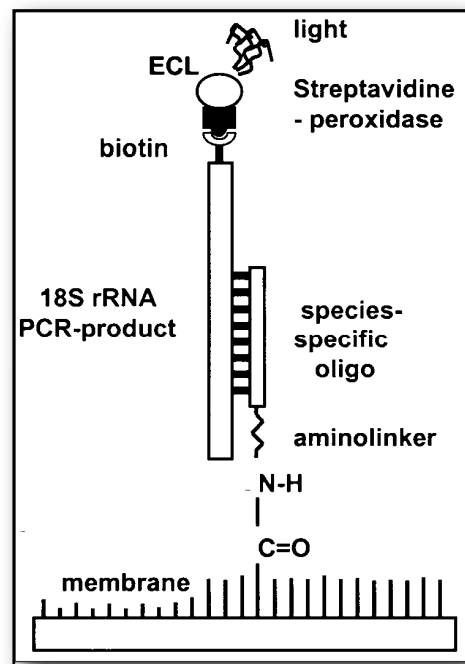


Fig. 9: Reazione luminosa che rende possibile la visione del risultato della RLB. (Tratto da: AAVV, non pubbl.)

# PCR Real Time

## Catch all

É stata messa a punto una PCR real time con chimica TaqMan® per la rilevazione di *Babesia spp.* Il principio della metodica prevede di accoppiare al set di primer utilizzato una sonda oligonucleotidica marcata con un fluoroforo e un quencer, l'idrolisi della sonda durante l'amplificazione porta ad una variazione della fluorescenza all'interno del pozzetto che viene letta e registrata dal ciclizzatore. Le PCR sono state eseguite su un ciclizzatore 7500 AppliedBiosystem e ogni campione è stato eseguito in tre repliche per minimizzare la possibilità di errore. I primer utilizzati nella reazione vanno ad amplificare un frammento di circa 100 bp della regione altamente conservata del gene 18S e sono: RFLB-F4 (5'-AGGACTTTGGTTCTATTTTGTGG-3') e RFLB-R2 (5'-CTAAGAATTTACCTCTGACAGT-3'), la sonda complementare alla sequenza amplificata è ProbeBspp (5'FAM-TTATGGTTAATAGGACCCGTT-TAMRA3')

Le quantità della mix per 1 reazione di amplificazione sono (volume totale: 25 µl):

Reagente	Volume
Primer RLB-F4	0,23 µl
Primer RLB-R2	0,23 µl
Sonda ProbeBspp	0,08 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5 µl
DNA	2,5 µl
Acqua	9,48 µl

Il protocollo di amplificazione prevede

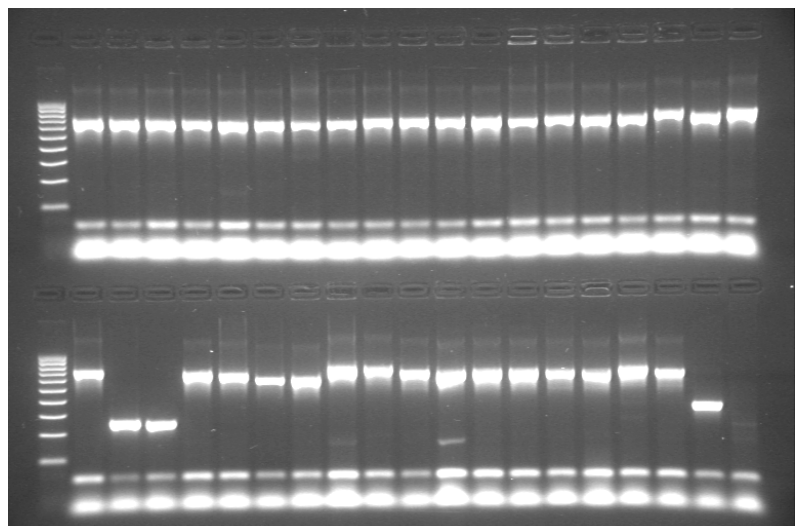
Stadio 1	50° C per 2'
Stadio 2	95° C per 10'
Stadio 3 (ripetuto 40 volte)	95° C per 15"
	60° C per 1'

## Clonaggio e Sequenziamento

Per una parte dei campioni risultati positivi in PCR e al RLB è stato richiesto il servizio di sequenziamento, presso il BMR Genomics dell'Università di Padova, per poter identificare in modo esatto la specie di piroplasma ritrovata nei campioni testati attraverso il confronto delle sequenze con quelle depositate in database.

Per procedere al sequenziamento si è deciso il clonaggio del frammento di interesse, partendo dalla purificazione della banda di PCR dal gel di agarosio dopo la corsa elettroforetica. Quindi il campione, una volta che ogni singola banda è stata ritagliata dal gel con un bisturi sterile, è stata purificata con il kit Nucleo Spin® Extract II (Macherey-Nagel). A questo punto il frammento purificato è stato inserito nel vettore plasmidico QIAGEN pDrive™ e sono stati trasformati dei batteri *E. coli* competenti e piastrati su capsule Petri con LB Agar addizionato di IPTG e X-gal, seguendo il protocollo fornito con il QIAGEN PCR Cloning<sup>plus</sup> Kit. Le colonie di batteri trasformati sono state selezionate in quanto appaiono di colore bianco: l'inserzione del DNA esogeno nel plasmide inattiva la funzionalità del promotore (LAC) della  $\beta$  galattosidasi (gene lacZ $\alpha$ ) presente sul plasmide stesso. Questo gene, se attivato, permetterebbe ai batteri di metabolizzare lo zucchero modificato X-Gal presente nel terreno di crescita producendo un precipitato di colore azzuro che caratterizza le colonie negative e manca in quelle positive. Per verificare l'effettiva presenza del frammento di DNA di interesse è stata effettuata una PCR da colonia con i primers specifici per il vettore (PUK-S e PUK-AS); la verifica su gel di agarosio, quando il vettore ha incorporato il frammento da clonare, presenterà una banda che corrisponde al peso molecolare del prodotto da clonare sommato alla parte di vettore amplificata (circa 200 bp). (Fig. 10)

Fig 10: Gel di verifica della PCR da colonia.  
Pozzetto 1: Marker bp 100  
Pozzetti da 2 a 20: Colonie positive  
Pozzetto 21: Marker bp 100  
Pozzetto 22: Colonia positiva  
Pozzetto 23-24: Colonie negative  
Pozzetto da 25 a 38: Colonie Positive  
Pozzetto 39: Colonia non trasformata di controllo  
Pozzetto 40: Controllo Negativo



Si è poi proceduto ad un inoculo su LB agar delle colonie scelte e sono state inviate al BMR Genomics dell'Università di Padova per procedere con il sequenziamento.

# Risultati

## Ricerca *Babesia equi* e *Babesia caballi*

I prelievi relativi ai cavalli sono stati testati con la PCR Babesia/Theileria catch all e con la PCR multiplex per la ricerca di *B.equi* e *B.caballi*. I risultati delle positività sono riportati in tabella:

<b>PCR Babesia/Theileria catch all</b>		<b>Percentuale Nazionale*</b>
Pos / Tot	%	
39 / 169	23	23
IC: 13,62 - 32,37		
<b>PCR <i>B. equi</i></b>		
Pos	%	
38 / 169	22,48	
IC: 13,21 - 31,74		
<b>PCR <i>B. caballi</i></b>		
Pos	%	
4 / 169	2,36	
IC: 0 - 5,36		

\* tratte da "Babesiosis in Italy: an overview. (Torina A., Caracappa S., 2007)

## Ricerca *Babesia canis*

I prelievi relativi ai cani sono stati testati con la PCR Babesia/Theileria catch all e con la nested PCR per la ricerca di *B.canis*. I risultati delle positività sono riportati in tabella:

PCR <i>Babesia/Theileria</i> catch all		Percentuale Nazionale*
Pos / Tot	%	
15 / 55	27,27	38
IC: 17,12 - 37,41		
<b>PCR <i>B. canis</i></b>		
Pos / Tot	%	
15 / 55	27,27	
IC: 17,12 - 37,41		

\* tratte da "Babesiosis in Italy: an overview. (Torina A., Caracappa S., 2007)

## Ricerca di *Babesia spp* in animali selvatici

Il DNA estratto dalle aliquote di milza prelevate durante le autopsie degli animali selvatici è stato testato utilizzando la PCR Babesia/Theileria catch all. I risultati, divisi per singola specie, sono riportati nelle relative tabelle:

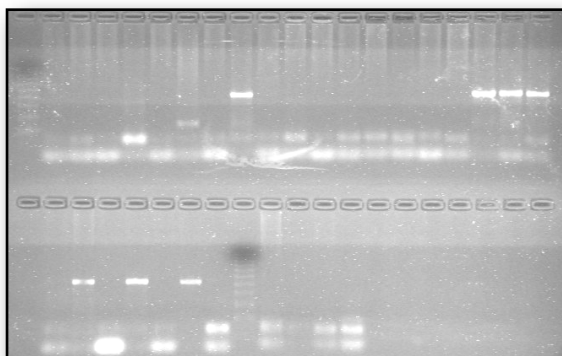
Provenienza	Specie									
	Capriolo		Cinghiale		Daino		Camoscio		Cervo	
	Pos/Tot	%	Pos/Tot	%	Pos/Tot	%	Pos/Tot	%	Pos/Tot	%
Provincia TO	17/66	25,75	2/32	6,25			11	0	2/8	25
		IC:15,87- 35,62		IC: 1,14 - 11,08						IC: 15,80 - 34,19
Provincia AL	14/32	43,75	8/40	20	16	0				
		IC: 30,98 - 56,51		IC: 11,33 - 28,66						
Provincia CN	14/36	38,88								
		IC: 26,82 - 50,93								
Provincia NO			0/15	0						
Isola d'Elba			11/12	91,66						
				IC: 73,68 - 100						

Capriolo			
Pos/Tot	%	Prevalenza	IC
45/134	33,5	0,335	0,255 - 0,415

Cervo			
Pos/Tot	%	Prevalenza	IC
2/8	25	0,25	0,158 - 0,341

Daino		Camoscio	
Tot	Pos	Tot	Pos
16	0	11	0

Cinghiale			
Pos/Tot	%	Prevalenza	IC
21/99	21,2	0,212	0,112 - 0,301



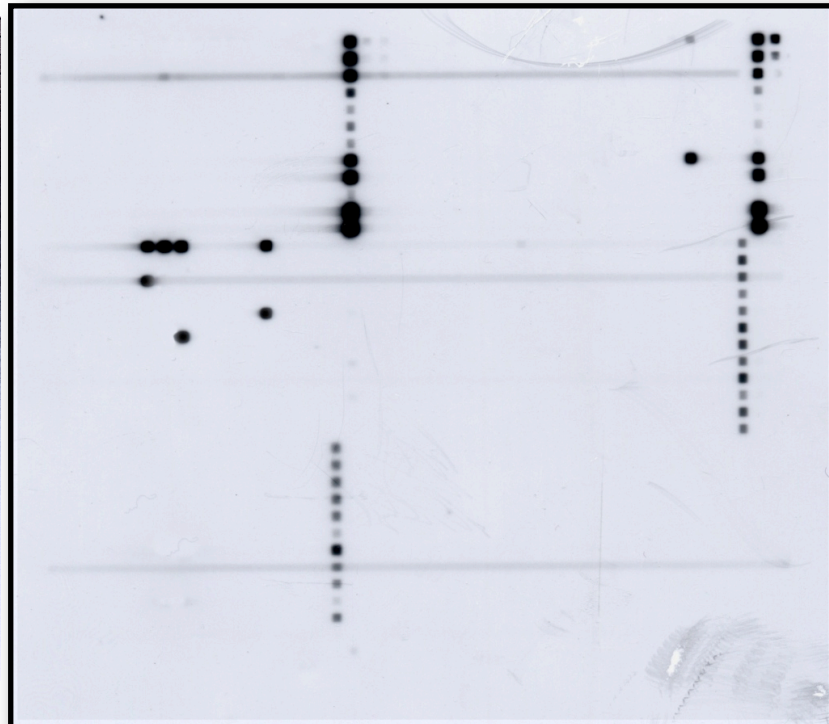
PCR catch all:  
 Pozzetto 1 e 28: Marker bp 100  
 Pozzetti 9, 18, 19, 20, 22, 24, 26: Campioni Positivi.



## Reverse Line Blot

I campioni precedentemente testati con la PCR Babesia/Theileria catch all sono stati testati in RLB per ottenere un'indicazione riguardo alla specie di Babesia ritrovata e per confermarne le positività. In tutti i campioni testati il RLB ha confermato la positività e le specie identificate per mezzo delle sonde specie-specifiche sono risultate essere: *B. bigemina* nel capriolo, *B. divergens* nel cinghiale e nel cervo.

1	Ehrlichia / Anaplasma
2	Anaplasma centrale
3	Anaplasma marginale
4	A. (Ehrlichia) phagocytophilum
5	A. (Ehrlichia) phagocytophilum
6	A. (Ehrlichia) phagocytophilum
7	A. (Ehrlichia) phagocytophilum
8	Ehrlichia ruminantium
9	Anaplasma (Ehrlichia) bovis
10	Ehrlichia chaffeensis
11	Ehrlichia sp. (Omatienne)
12	Ehrlichia ovina/canis
13	Theileria/Babesia catch-all
14	Babesia felis
15	Babesia divergens
16	Babesia microti
17	Babesia bigemina
18	Babesia bovis
19	Babesia rossi
20	Babesia canis
21	Babesia vogeli
22	Babesia major
23	Babesia bicornis
24	B. cabbali <sup>3</sup>
25	Theileria sp. (kudu)
26	Theileria sp. (sable)
27	Theileria bicornis
28	Theileria annulata
29	Theileria buffeli
30	Theileria sp. (buffalo)
31	Theileria mutans
32	Theileria parva
33	Theileria taurotragus
34	Theileria velifera
35	Theileria equi
36	Theileria festoquardi



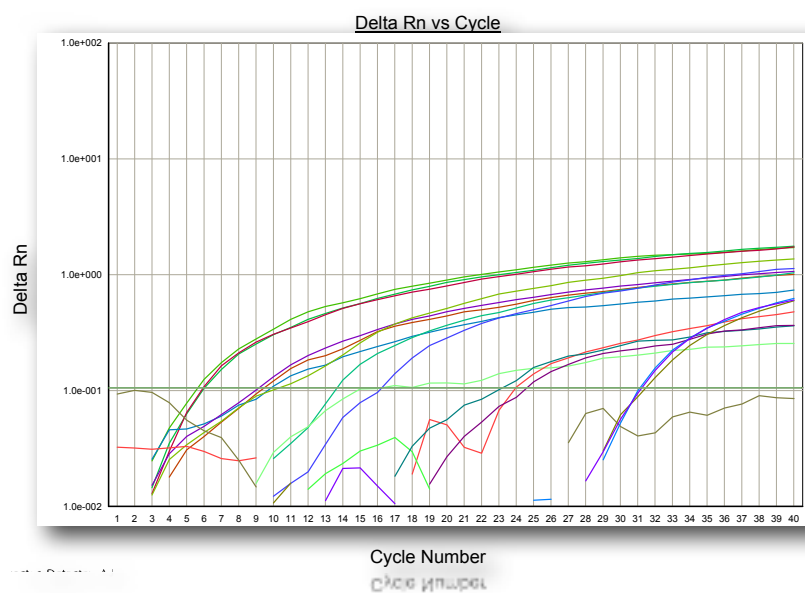
# PCR Real Time

## Catch all

La real time PCR è stata confrontata con i risultati ottenuti sui campioni di animali testati con la PCR catch all standard:

		PCR standard		
		POS	NEG	TOT
PCR Real Time	POS	36	2	38
	NEG	3	23	26
				64

Indice di correlazione: 92,1%  
 Sensibilità: 92,3%  
 Specificità: 92,0%  
 Valore predittivo Positivo: 94,7%  
 Valore predittivo Negativo: 88,5%  
 IC 95%



# Sequenziamento

I file contenenti le sequenze, inviateci dal BMR Genomics, sono stati esaminati con il software FinchTV 1.4.0 © della Geospiza Inc. per individuare ed estrapolarne la sequenza corrispondente alla regione di interesse del gene 18S. Quindi le sequenze sono state confrontate, tramite BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, disponibile all'indirizzo web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con le sequenze già presenti in database per arrivare all'identificazione delle specie di babesia ritrovate. (Tab. 3)

Campione (Provenienza)	Sequenza	Esito BLAST	
		Accession Number	Descrizione
Capriolo (AL)	GACAAGAAATAACAATACAGGGCTTCGTCTTGAATTGGAATGATG GTGATGTACAACCTCACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTCAGCCTCGCGTTTTTCCC TCTTTTCGGGTCTTTTCGCTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGTTCGAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAA TAGAGTAGGACCTTGGTCTATTTTGTGGTTTCGAGCCTTGGTAAT GGTAATAGGAACGGTTGGGGCA	FJ426361.1	Babesia bigemina isolate BRC02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Cinghiale (Elba)	GACAAGAAATAACAACCTCGGACCTCACACGAGGTTACGAGATTGCAA TGAGAACAAATTTAAACCACTTATCGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTC TGGTGCCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTA GTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTCGCGCCGCGCTAT TCTCGGCTCCCTGAGTCGGTTTGTGCTGGTCATCCGTATGGGAAG CTAGCTCGGCCCTTCACTGGTCCGCTAGTGGATCATACTACTTT GAAAAAATTAGAGTGTTCAGGCAGGCAATGCTTGGATACTGCAGC ATGGAATAATGGAATAGGACTTTGACCTATTTGTGGTTTCTCGAGG TCAAAGTAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCA	AY918952.1	Babesia microti strain AF41002 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Cinghiale 1 (Elba)	GACAAGAAATAACAACCTCGGACCTCACACGAGGTTACGAGATTGCAA TGAGAACAAATTTAAACCACTTATCGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTC TGGTGCCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTA GTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTCGCGCCGCGCTAT TCTCGGCTCCCTGAGTCGGTTTGTGCTGGTCATCCGTATGGGAAG CTAGCTCGGCCCTTCACTGGTCCGCTAGTGGATCATACTACTTT GAAAAAATTAGAGTGTTCAGGCAGGCAATGCTTGGATACTGCAGC ATGGAATAATGGAATAGGACTTTGACCTATTTGTGGTTTCTCGAGG TCAAAGTAATGATTAATAGGGACAGTTGGGGCA	AY918952.1	Babesia microti strain AF41002 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Cinghiale 2 (Elba)	GACAAGAAATAACAATACAGGGCAATGTCTTGAATTGGAATGATG GTGACCTAAACCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTTCGCTGGTGTAAATATG ACTGATGTCGAGATTGCACTTCGCTTTTGGGATTTTCCCTTTTAC TTTGAGAAAATTAGAGTGTTCGAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACT CAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTCTATTTTGTGGTTG TGAACTTAGTAATGGTAAATAGGAACGGTTGGGGCA	DQ866844.1	Babesia divergens strain 2843/04 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Campione (Provenienza)	Sequenza	Esito BLAST	
		Accession Number	Descrizione
Cinghiale (AL)	GAAATAACAATAACAGGGCTTCGTCTTGTAAATGGAATGATGGTGAT GTACAACCTCACCAGGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC AGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCCTATATTAACCTTGTTCAG TTAAAAGCTCGTAGTTGATTTTCAGCCTCGCCTTTTTTCCCTTTTG TTGGGTCTTTTCGTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATAGAGTG TTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAAGAG TAGGACCTTGGTCTATTTTGTGGTTTTGAGCCTTGGTAATGGTTA ATAGGAACGGT	DQ316966.1	Babesia bigemina 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Cinghiale (TO)	GACAAGAAATAACAATACGGGGCTTCGTCTTGTAAATGGAATGATG GTGATGTACAACCTCACCAGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCCTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGATTTTCAGCCTCGCCTTTTTTCCC TCTTTTCGGGTCTTTTCGTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAA TAGAGTAGGACCTTGGTCTATTTTGTGGTTTTTCAGCCTTGGTAAT GGTTAATAGGAACGGTTG	FJ426361.1	Babesia bigemina isolate BRC02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Cervo (TO)	GTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTTGTGACGAATTCAGATT CTAAGAATTCACCTCTGACAGTAAATACGAATGCCCAACCCGTT CCTATTAACCATTAAGGTTCAACAACCAACAAAATAGAACCAA GTCTACTCTATTATTCATGCTGAAGTATTCAGACAAAAGTCTGC TTGAAACACTCTAATTTTCTCAAAATAAAGGGAAAAATCCCAAAA GCGAAGTGCAATCTCGACATCAGTCAATATTAACACACGCAAAAAT TCAACTACGAGCTTTTACTGCAACAAGTTAATATACGCTATTGGA GCTGGAATTACCGGGCTGCTGGCACCAGACTGCCCCCAATTGTT ACTCTGGTGAGGGTTT	AY098643.2	Babesia divergens small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Capriolo (TO)	GACAAGAAATAACAATACAGGGCTTCGTCTTGTAAATGGAATGATG GTGATGTACAACCTCACCAGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCCTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGATTTTCAGCCTCGCCTTTTTTCCC TCTTTTCGGGTCTTTTCGTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAA TAGAGTAGGACCTTGGTCTATTTTGTGGTTTTTCAGCCTTGGTAAT GGTTAATAGGAACGGTTGGGGCA	FJ426361.1	Babesia bigemina isolate BRC02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Capriolo (CN)	GACAAGAAATAACAATACAGGGCTTCGTCTTGTAAATGGAATGATG GTGATGTACAACCTCACCAGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCCTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGATTTTCAGCCTCGCCTTTTTTCCC TCTTTTCGGGTCTTTTCGTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAA TAGAGTAGGACCTTGGTCTATTTTGTGGTTTTTCAGCCTTGGTAAT GGTTAATAGGAACGGTTGGGGCA	FJ426361.1	Babesia bigemina isolate BRC02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Capriolo 2 (CN)	GACAAGAAATAACAATACAGGGCTTCGTCTTGTAAATGGAATGATG GTGATGTACAACCTCACCAGAGTACCAATGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCGGTAATTCAGCTCCAATAGCCTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAGCTCGTAGTTGATTTTCAGCCTCGCCTTTTTTCCC TGGTTTTGGGTCTTTTCGTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAA TAGAGTAGGACCTTGGTCTATTTTGTGGTTTTTCAGCCTTGGTAAT GGTTAATAGGAACGGTTGGGGCA	EF458200.1	Babesia bigemina isolate B_bi11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Bovino Ceva	gacaagaaataccaatacggggctactgctctgtaattggcatgggg gcaaccttcaccctcgcccgagtaccattggagggcaagtctggtg ccagcagccggtaattccagctccaatagcgtatataaacttgtg tgcagttaaaagctcgtagtttacttttcgtctcctcgtattggtg tttactaggcgggacgctcttactttgagaaaatagagtggtt caagcaggtttgctctgataattgagcattggaataaacttgtatga cctgtgtagcgttgggttgccttgggtaatggtaataaggaacggt tgggggca	EF458208.1	Babesia bovis isolate B_bo19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Campione (Provenienza)	Sequenza	Esito BLAST	
		Accession Number	Descrizione
Bovino Caramagna	GACAAGAAACCCGAAAGTACCTACGGGTCTGGGTCTTGAGACTGCAA CCCTGGGAAGGGAAATGGAAAGCGAGATCGAATAGGCTCAGAATCTC ATGAGTCAGGATTTAATCTTTAGAAACAACCTGCCTGAAGCTTGTCCT GATAATTTTCTGTGTTTGATCTCAGAAGCTGGACTTAATTGTGTCC AGAAATAATCAAAATAGGACTGTAGAAGCTTCCTGGCAAATGTGA AAGAGGAAGTCAGAAAGTTCTAGTATATGAGAATGTTAATGATTC TTTTTATGCATAGTTCAAGAAGCTTATCAGATGACTTAACCTCCCTGAG AACCAATGAAGGATCCTCCACTAACAGGGAGTAAAAATACACTGT CAGA	L19078.1	Babesia bovis (BBOV3) 18S ribosoma RNA
B. bigemina Controllo POS	GACAAGAAATAACAATACGGGGCTTTCGTCTTGAATTGGAATGATG GTGATGTACAACCTCACCAGATACCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTTATTTTCAGCCTCGCGTTTTTCCC TGGTTTTGGGTCTTTTCGCTGGCTTTTTTTTACTTTGAGAAAATTA GAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATCTCAGCATGGAATAA TAGAGTAGGACCTTGGTCTATTTTGTGTGTTTTGAGCCTTGTAAAT GGTTAATAGGAACGGTTGGGGCA	DQ316966.1	Babesia bigemina 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
B. bovis Controllo POS	GACAAGAAATACCAATACGGGGCTACTGCTCTGTAATTGGCATGGGG GCGACGTTACCCCTCGCCGAGTACCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCAGCAGCCCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGT TGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTTACTTTTCGCTCCTCGCTATTTGTG TTTTCACTAGCCGGGACGCTCGTTACTTTGAGAAAATAGAGTGTTC CAAGCAGGTTTTGCCTGTATAATTGAGCATGGAAATACCTTGTATGA CCCTGCTACCGTTGGTTGCCTTGGTAAATGGTTAAATAGGAACGGT TGGGGCA	EF601930.1	Babesia bovis from Israel 18S ribosomal RNA gene, partial sequence

Le sequenze sono state allineate con il software ClustalX (1.83.1) di Thompson J.D.

CLUSTAL X (1.83.1) multiple sequence alignment

```

Cinghiale3_Elba      GACAAGAAATAAC---AATCGGACCTCACACGAGGTTACGAGATTGCAATGAGAACAAT
Cinghiale1_Elba     GACAAGAAATAAC---AATCGGACCTCACACGAGGTTACGAGATTGCAATGAGAACAAT
Cinghiale1_AL       -----GAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Cinghiale2_AL       -----GAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Cinghiale3_AL       -----GAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo3_AL        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo1_AL        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo2_AL        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo1_TO        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo2_TO        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Cinghiale1_TO       GACAAGAAATAAC---AATACGGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Cinghiale2_TO       GACAAGAAATAAC---AATACGGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo1_CN        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo2_CN        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Capriolo3_CN        GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
bigemina_CP         GACAAGAAATAAC---AATACGGGGCTTTC-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAT
Cinghiale2_Elba     GACAAGAAATAAC---AATACAGGGCAATT-----GTCTTGTAATTGGAATGATGGTGAC
Ceva                 GACAAGAAATACC---AATACGGGGCTACT-----GCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGAC
Caramagna           GACAAGAAATACC---AATACGGGGCTACT-----GCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGAC
bovis_CP             GACAAGAAATACC---AATACGGGGCTACT-----GCTCTGTAATTGGCATGGGGGCGAC
Cervo_TO            GTCTAGAGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCTT-----GTCGACGAATTCAGATTCTAAGAAAT
                    **  *  *      *                *                ***  **      *

```

```

Cinghiale3_Elba      TTAAACCAC--TTATCGAGTAACAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCCGGGTA
Cinghiale1_Elba     TTAAACCAC--TTATCGAGTAACAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCCGGGTA
Cinghiale1_AL       GTACAACCT--CACCAGGGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCCGGGTA
Cinghiale2_AL       GTACAACCT--CACCAGGGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCCGGGTA
Cinghiale3_AL       GTACAACCT--CACCAGGGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCCGGGTA
Capriolo3_AL        GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCCGGGTA

```

Capriolo1\_AL GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Capriolo2\_AL GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Capriolo1\_TO GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Capriolo2\_TO GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Cinghiale1\_TO GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Cinghiale2\_TO GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Capriolo1\_CN GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Capriolo2\_CN GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Capriolo3\_CN GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 bigemina\_CP GTACAACCT--CACCAGAGTACCAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Cinghiale2\_Elba CTA AACCT--CACCAGAGTAA CAATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Ceva CTTCACCCT--CGCCCGAGTACCCATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Caramagna CTTCACCCT--CGCCCGAGTACCCATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 bovis\_CP GTTCACCCT--CGCCCGAGTACCCATTGGAGGGCAAGT-CTGGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 Cervo\_TO TTCAACCTCTGACAGTTAAATACGAAT--GCCCCAACCGTTCTATTAAACCATTACTAAG  
 \* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Cinghiale3\_Elba ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTT  
 Cinghiale1\_Elba ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTT  
 Cinghiale1\_AL ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Cinghiale2\_AL ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Cinghiale3\_AL ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo3\_AL ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo1\_AL ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo2\_AL ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo1\_TO ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo2\_TO ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Cinghiale1\_TO ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Cinghiale2\_TO ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo1\_CN ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo2\_CN ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Capriolo3\_CN ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 bigemina\_CP ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTT  
 Cinghiale2\_Elba ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTT  
 Ceva ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTTACTT  
 Caramagna ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAATAGCTCGTAGTTTACTT  
 bovis\_CP ATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAACTTGTGTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTTACTT  
 Cervo\_TO GTTCAACAACCAAAAATAGAACCAAGTCTACTCTATTATTCATGCTGAAGTATTC  
 \*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Cinghiale3\_Elba CTGGCCGGCGCTATTCTCGGCTCCCTGAGTCGGTTTAGTGCTTGGTCATCCGTATGGGAA  
 Cinghiale1\_Elba CTGGCCGGCGCTATTCTCGGCTCCCTGAGTCGGTTTAGTGCTTGGTCATCCGTATGGGAA  
 Cinghiale1\_AL CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTTT----TGTTGGGTCT-----  
 Cinghiale2\_AL CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTTT----TGTTGGGTCT-----  
 Cinghiale3\_AL CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTTT----TGTTGGGTCT-----  
 Capriolo3\_AL CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTTT----TTTGGGTCT-----  
 Capriolo1\_AL CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Capriolo2\_AL CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Capriolo1\_TO CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Capriolo2\_TO CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Cinghiale1\_TO CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Cinghiale2\_TO CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Capriolo1\_CN CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTCT----TTTCGGGTCT-----  
 Capriolo2\_CN CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTGG----TTTGGGTCT-----  
 Capriolo3\_CN CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTGG----TTTGGGTCT-----  
 bigemina\_CP CAGCCTCGCGTT--TTT----TCCCTGG----TTTGGGTCT-----  
 Cinghiale2\_Elba TTGCGTGGTGTAAATAT--TGA CTGA--TGTCGAGATTGCA-----  
 Ceva TTCGTCTCTCGCT-----ATTGTGTTT-----  
 Caramagna TTCGTCTCTCGCT-----ATTGTGTTT-----  
 bovis\_CP TTCGTCTCTCGCT-----ATTGTGTTT-----  
 Cervo\_TO AAGACAAAAGCTTGCTT--GAAACACTCTAATTTTCTCAAAGTAAAA-----AG  
 \* \*

Cinghiale3\_Elba GCTAGCTCGGCCCTTCACTGGTGGCTAGTGGATCATACTTTACTTTGAAAAAATTAGA  
 Cinghiale1\_Elba GCTAGCTCGGCCCTTCACTGGTGGCTAGTGGATCATACTTTACTTTGAAAAAATTAGA  
 Cinghiale1\_AL -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Cinghiale2\_AL -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Cinghiale3\_AL -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo3\_AL -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo1\_AL -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo2\_AL -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo1\_TO -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTACTTTGAGAAAATTAGA

Capriolo2\_TO -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Cinghiale1\_TO -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Cinghiale2\_TO -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo1\_CN -----TTTCGCT---GGCTTTGT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo2\_CN -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Capriolo3\_CN -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 bigemina\_CP -----TTTCGCT---GGCTTTTT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Cinghiale2\_Elba -----CTTCGCTTTTGGGATTTTCCCT-----TTTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Ceva -----TCACTAGGCGGGACGCCT-----CGTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Caramagna -----TCACTAGGCGGGACGCCT-----CGTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 bovis\_CP -----TCACTAGGCGGGACGCCT-----CGTTACTTTGAGAAAATTAGA  
 Cervo\_TO GGAAAAATCCAAAAGCGAAGTGCAATCTCGACATCAGTCAATATTAACACCACGCAAAA  
 \* \* \*\* \* \* \*

Cinghiale3\_Elba GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATGGAATAGGACTTTG  
 Cinghiale1\_Elba GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATGGAATAGGACTTTG  
 Cinghiale1\_AL GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Cinghiale2\_AL GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Cinghiale3\_AL GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo3\_AL GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo1\_AL GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo2\_AL GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo1\_TO GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo2\_TO GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Cinghiale1\_TO GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Cinghiale2\_TO GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo1\_CN GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo2\_CN GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Capriolo3\_CN GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 bigemina\_CP GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACCTTG  
 Cinghiale2\_Elba GTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTG  
 Ceva GTGTTTCAAGCAGG-TTTTG-CCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTG  
 Caramagna GTGTTTCAAGCAGG-TTTTG-CCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTG  
 bovis\_CP GTGTTTCAAGCAGG-TTTTG-CCTGTATAATTGAGCATGGAATAACCTTGTATGACCCTG  
 Cervo\_TO ATTCAACTACGAGCTTTTACTGCAACAAGTTAATATACGCTATTGGAGCTGGAATTAC  
 \* \* \*\* \*\* \* \* \*\* \*\* \*\*

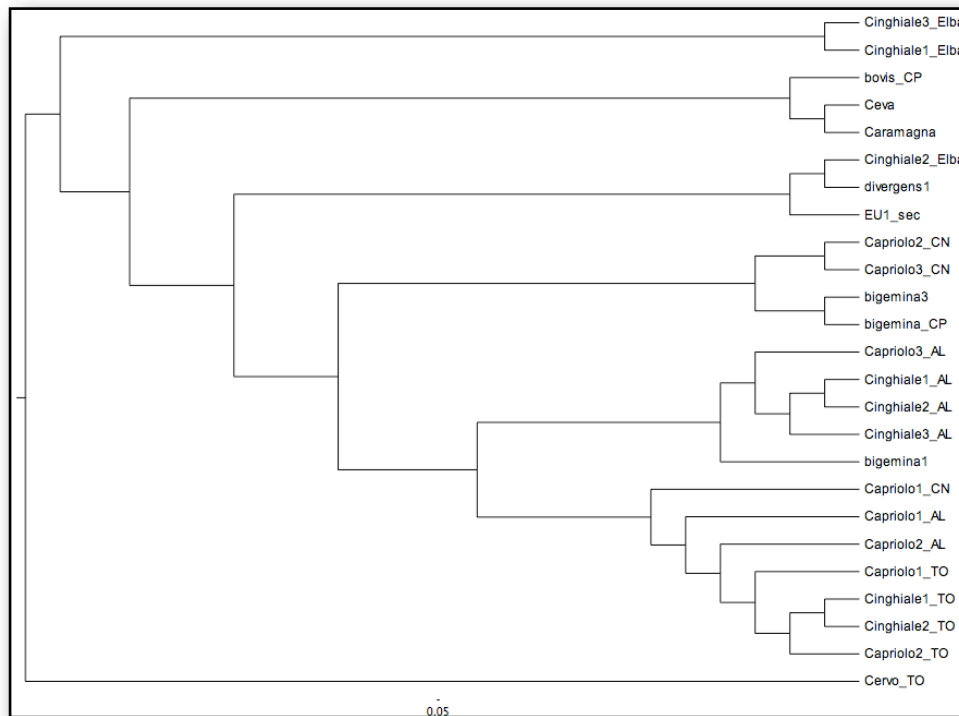
Cinghiale3\_Elba AC-CTATTT-GTTGGTTTCTCGAGGTCAAAGTAATGATTAAT--AGGGACAGTTGGGGGC  
 Cinghiale1\_Elba AC-CTATTT-GTTGGTTTCTCGAGGTCAAAGTAATGATTAAT--AGGGACAGTTGGGGGC  
 Cinghiale1\_AL GTTCTATTTTGTGGTTT--TGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGT-----  
 Cinghiale2\_AL GTTCTATTTTGTGGTTT--TGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGT-----  
 Cinghiale3\_AL GTTCTATTTTGTGGTTT--TGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGT-----  
 Capriolo3\_AL GTTCTATTTTGTGGTTT--TGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Capriolo1\_AL GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Capriolo2\_AL GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Capriolo1\_TO GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Capriolo2\_TO GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Cinghiale1\_TO GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTG-----  
 Cinghiale2\_TO GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTG-----  
 Capriolo1\_CN GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Capriolo2\_CN GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Capriolo3\_CN GTTCTATTTTGTGGTTT--CGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 bigemina\_CP GTTCTATTTTGTGGTTT--TGAG-CCTTGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Cinghiale2\_Elba GTTCTATTTTGTGGTTT--TGAA-CCTTAGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Ceva ---TCGTACCGTTGGTT-----GCCTTGGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Caramagna ---TCGTACCGTTGGTT-----GCCTTGGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 bovis\_CP ---TCGTACCGTTGGTT-----GCCTTGGGTAATGGTTAAT--AGGAACGGTTGGGGGC  
 Cervo\_TO ---CGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCTCCAATTGTTACTCTGGTGAGGGTTT-----  
 \* \*\* \* \*\* \* \* \*

Cinghiale3\_Elba A  
 Cinghiale1\_Elba A  
 Cinghiale1\_AL -  
 Cinghiale2\_AL -  
 Cinghiale3\_AL -  
 Capriolo3\_AL A  
 Capriolo1\_AL A  
 Capriolo2\_AL A  
 Capriolo1\_TO A  
 Capriolo2\_TO A  
 Cinghiale1\_TO -  
 Cinghiale2\_TO -

Capriolo1_CN	A
Capriolo2_CN	A
Capriolo3_CN	A
bigemina_CP	A
Cinghiale2_Elba	A
Ceva	A
Caramagna	A
bovis_CP	A
Cervo_TO	-

## Analisi Filogenetica

La successiva analisi filogenetica è stata eseguita sulla base dell'allineamento operato dal software ClustalX (1.83.1). Una prima analisi è stata fatta utilizzando la matrice di distanza che fornisce ClustalX e visualizzata con il programma NJplot (Perriere and Gouy 1996) (Fig. 11)



In un secondo momento i dati sono stati analizzati con altre elaborazioni, quali maximum likelihood, maximum parsimony e neighbor-joining, per verificare la robustezza dei risultati. In questo secondo momento è stato utilizzato il software Phylo Win 2.0 (Galtier, Gouy et al. 1996) Questa ulteriore analisi è stata messa in atto per evidenziare più chiaramente le relazioni evolutive esistenti tra diverse entità.



## **Maximum likelihood**

Questo sistema statistico vaglia le varie ipotesi e sceglie quella che rende i dati più plausibili. (Felsenstein 1981) Uno dei vantaggi di questo metodo è che risulta essere statisticamente consistente per definizione e consente l'impiego di modelli di evoluzione sofisticati e realistici; d'altra parte è estremamente dispendioso dal punto di vista computazionale, e non è utilizzabile per un numero elevato di taxa.

## **Maximum parsimony**

La maximum parsimony (Fitch 1971) utilizza tutta l'informazione contenuta nei dati operando direttamente sui singoli caratteri piuttosto che su matrici di distanza. Questo metodo si basa sul principio che nella scelta delle possibili spiegazioni di un certo fenomeno occorre preferire la più semplice, cioè quella che richiede meno ipotesi ad hoc., in pratica trova l'albero che spiega le sequenze osservate con il numero minimo di sostituzioni.

## **Neighbour-joining**

Il sistema usato dal neighbour-joining si basa sulla valutazione della distanza tra due elementi sottraendo la distanza media di ciascuna di queste rispetto a tutti gli altri. In altre parole, il neighbor-joining non considera semplicemente la distanza tra le coppie per costruire l'albero ma valuta la distanza rispetto a tutti gli altri punti. Gli alberi costruiti con neighbor-joining possono ricostruire in modo esatto la topologia di sequenze che non seguono l'orologio molecolare. (Saitou and Nei 1987) (Fig. 12)

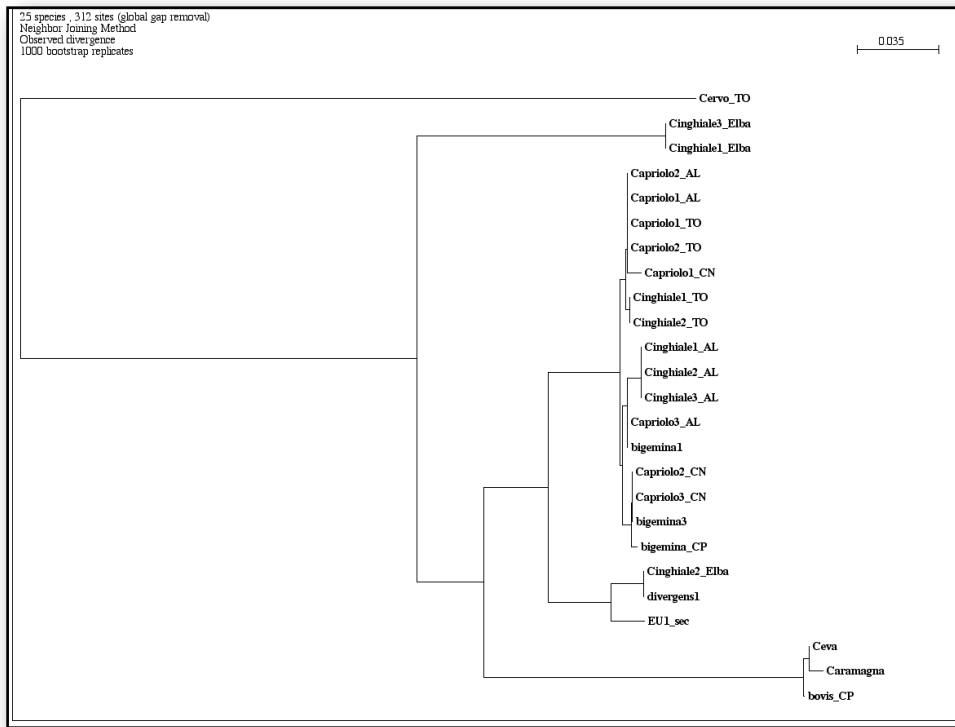


Fig. 12: Albero ottenuto con il metodo del neighbour-joining

# Conclusioni

## Metodologie biomolecolari

Nel 2001 Prichard e Tait (Prichard and Tait 2001) affermavano che le nuove tecniche di biologia molecolare, attraverso l'uso di sonde molecolari e di microarray a DNA sarebbero state di grande aiuto nella diagnosi e nello studio dei parassiti di interesse veterinario. Di sicuro un'espansione in questa direzione c'è stata, documentata anche dal crescente numero di pubblicazioni che hanno come argomento l'utilizzo di metodiche basate sulla biologia molecolare, al punto che dalla prima PCR applicata alla diagnosi di piroplasmosi (Fahrimal, Goff et al. 1992) ormai il numero di pubblicazioni indicizzate su PubMed che riguardano tale argomento supera di gran lunga le 200 unità. Ma l'universo delle piroplasmosi, parafrasando Criado-Fornelio et al., (Criado-Fornelio, Gonzalez-del-Rio et al. 2004) è attualmente in espansione sia da un punto di vista genetico che di identificazione dei possibili ospiti intermedi. Nel corso del nostro lavoro abbiamo ritenuto interessante testare diverse metodologie di biologia molecolare (PCR standard, PCR multiplex, PCR nested e seminested, PCR real time, RLB) per cercare di identificare una metodica utilizzabile sia in diagnosi che in fase di screening epidemiologico. La reazione a catena della polimerasi è stata scelta principalmente per la capacità di amplificare piccole quantità di DNA (sensibilità) in modo specifico per la sequenza per la quale è progettata. Un'altra caratteristica vantaggiosa di tale metodica è la possibilità di utilizzare come matrice di partenza non solo normali prelievi di sangue, ma anche tessuti, valore aggiunto soprattutto considerando un punto di vista pratico, in quanto per indagini di screening epidemiologico per quel che riguarda la fauna selvatica, non sempre si può operare su prelievi di sangue. (Hurkova and Modry 2006)

Il primo problema da affrontare è la bassa parassitemia: infatti è stato osservato in infezioni sperimentali di *B.canis*, livelli di parassitemia estremamente bassi con meno dell'1% degli eritrociti che risulta infetto (Schetters, Kleuskens et al. 2009) mentre per animali affetti da *B.divergens* e *B.bigenima* il limite di parassitemia può toccare livelli di 10<sup>-6</sup>% di eritrociti infetti e addirittura 10<sup>-8</sup>% per *B.bovis*. (Gubbels, de Vos et al. 1999) Inoltre la condizione di anemia in cui può trovarsi l'animale infetto porta ad un'ulteriore diminuzione del numero totale di parassiti per volume di sangue, abbassando così il limite inferiore di sensibilità che deve avere la metodica diagnostica. (Birkenheuer, Levy et al.

2003) Per ovviare a questa condizione sono state essenzialmente messe in opera due diverse opzioni: estrazione del DNA da coagulo e nested PCR.

L'estrazione del DNA da coagulo ovvia in parte alla possibile bassa carica parassitaria con l'azione di spremitura del coagulo che porterebbe ad un aumento della concentrazione dei globuli rossi, aumentando di conseguenza il numero di possibili parassiti ritrovabili. I 40 campioni eseguiti in doppio, quindi amplificando il DNA estratto sia dal sangue intero con coagulante sia dal coagulo, hanno mostrato come la multiplex PCR per la ricerca *Babesia equi-Babesia caballi* abbia dato esito positivo per 10 campioni sui 40 totali solo con l'estrazione da coagulo, mentre l'estrazione da sangue intero ha dato esito negativo in PCR in 40 campioni su 40. (Fig. 13)

Questo inconveniente può essere evitato anche utilizzando una nested PCR, andando così ad aumentare la sensibilità del test con una successiva amplificazione. È riportato in bibliografia che la sensibilità può raggiungere livelli di parassitemia di  $10^{-12}\%$  a fronte del  $10^{-6}\%$  della PCR standard. (Schnittger, Yin et al. 2004)

Per queste ragioni il nostro test di riferimento è stato la PCR seminested catch all, accoppiata con la Reverse Line Blot: la possibilità di analizzare campioni multipli con sonde multiple ha il grande vantaggio di poter consentire l'identificazione simultanea di diversi patogeni. Per l'uso routinario però non è di semplice applicazione, da qui l'esigenza di sviluppare una real time PCR che attraverso diverse sonde specie-specifiche possa raggiungere il medesimo risultato con anche un minor dispendio di tempo.

Il fattore limitante per il disegno della real time PCR è stato senza dubbio la quantità di sequenze per le varie specie di *Babesia* disponibili in database, limitando le possibilità del disegno di sonde e primer al solo gene 18S. La real time PCR catch all ha dato sicuramente dei buoni risultati di riproducibilità e specificità, ma ha comunque la grande limitazione di identificare solo la presenza di *Babesia spp* o *Theileria spp*, non consentendo al momento la possibilità di distinguere le singole specie o almeno le specie

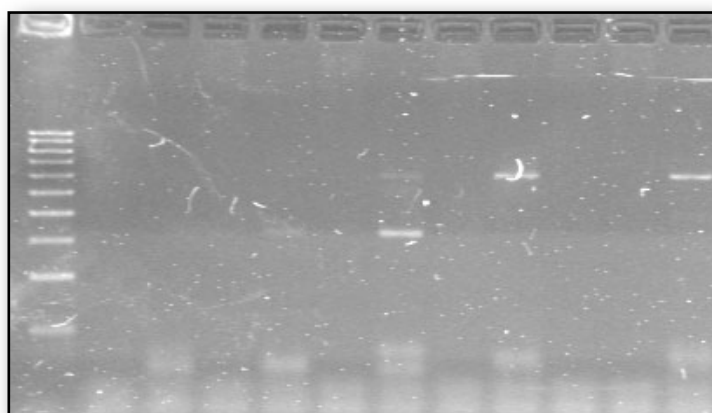


Fig. 13: PCR *B. equi-B. caballi*  
Pozzetto 1: Marker 100 bp  
Pozzetto 2 e 3: campione 1, sangue (-) e coagulo (-)  
Pozzetto 4 e 5: campione 2, sangue (-) e coagulo (+)  
Pozzetto 6 e 7: campione 3, sangue (-) e coagulo (+)  
Pozzetto 8 e 9: campione 4, sangue (-) e coagulo (+)  
Pozzetto 10 e 11: campione 5, sangue (-) e coagulo (-)  
Pozzetto 12: Controllo Positivo *B. equi*

patogene. Un disegno ottimale di real time PCR dovrebbe prevedere di unire nello stesso saggio più sonde per diverse specie di *Babesia*, in modo da emulare ciò che avviene con il RLB, non includendo tutte le sonde per ogni possibile piroplasma, ma almeno accoppiare la sonda catch all con le sonde complementari alle specie di *Babesia* più frequenti per la specie animale che si va a testare.

## ***Babesia spp* in animali domestici**

I risultati ottenuti dal nostro screening sugli animali domestici ha rilevato un quadro in linea con i dati riportati in bibliografia per quel che riguarda la distribuzione di *Babesia* nelle diverse specie in Italia. La più rappresentata specie di *Babesia* che si ritrova negli allevamenti bovini, e che riveste una grande importanza economica, è *B.bovis* (Torina and Caracappa 2007), ed effettivamente è l'unica specie da noi ritrovata nei due allevamenti testati. (Prevalenza 0,543; IC: 0,406 - 0,685) Il dato più interessante riguarda la positività ritrovata nell'allevamento in cui gli animali non sono portati al pascolo. In questo caso, l'ipotesi più probabile di contagio potrebbe essere dato dall'introduzione annuale di nuovi capi, alcuni dei quali potrebbero essere stati infetti e aver così dato il via ad un ciclo interno alla stalla in grado di automantenersi. Fosse verificata la circolazione all'interno della stalla di *B.bovis* potrebbe rendersi necessario uno screening per tale malattia degli animali messi in vendita.

Tra i cani testati, la specie di *Babesia* ritrovata è stata *B.canis* (Prevalenza: 0,272; IC: 0,172 - 0,374): l'identificazione della specie infettante è importante in quanto le diverse specie ritrovabili nel cane sono caratterizzate da differente virulenza, differente prognosi e rispondono a terapie differenti. (Birkenheuer, Levy et al. 2003) Questa specie di *Babesia* è la più comune in Europa, presenta virulenza variabile ma la terapia ha generalmente buon esito, al punto da poter essere considerata un problema controllabile.

Tra le scuderie e i maneggi si è messa in luce la circolazione quasi esclusiva di *B.equi* (Prevalenza: 0,224; IC: 0,132 - 0,317) al confronto di un'esigua presenza di *B.caballi* (Prevalenza: 0,023; IC: 0 - 0,05), dati per altro in linea con le percentuali riportate per il territorio italiano. (Torina and Caracappa 2007)

## ***Babesia spp* in animali selvatici**

Ormai le segnalazioni di piroplasmii in differenti animali selvatici hanno raggiunto un livello considerevole e l'interesse per un eventuale ciclo silvestre che potrebbe mantenere il parassita è anche dato dal fatto che i casi di babesiosi umana segnalati in Europa e in Italia sono collegati ad animali selvatici e a soggetti in contatto appunto con questa realtà. (Penzhorn 2006) Analizzando le positività alla PCR catch all e confrontandole in base alla specie silvestre si mette in evidenza come sia significativa, lì dove si ha sovrapposizione geografica tra caprioli e cinghiali, la maggior positività riscontrata tra i caprioli. (Tab. 4)

	POS	NEG	TOT
Capriolo	45 (19%)	89 (38%)	134 (58%)
Cinghiale	21 (9%)	78 (33%)	99 (42%)

Tab. 4: Fisher's Exact Test. P value: 0.0407, IC (95%): 1,03 - 3,42 Odds ratio= 1.878

Mentre l'alta positività riscontrata tra i cinghiali provenienti dall'Isola d'Elba potrebbe essere attribuita al fatto che questo animale rappresenti sull'isola l'unico ungulato di grosse dimensioni e quindi probabilmente l'ospite di elezione per il ciclo silvestre di *Babesia*. Considerando invece le diverse provenienze geografiche appartenenti alla stessa specie animale, utilizzando il Fisher's Exact Test, non sono state riscontrate differenze significative.

A questo punto si è ritenuto necessario procedere con il sequenziamento di una parte dei campioni positivi, per poter procedere alla precisa identificazione e al confronto delle varie specie. Il sequenziamento ha evidenziato come tra i caprioli circoli *B.bigemina* a prescindere dalla provincia di provenienza dell'animale. (Tab. 3) Discorso differente per quel che riguarda il cinghiale, infatti le positività riscontrate nelle provincie di Torino e

Alessandria sono risultate ascrivibili a *B.bigemina* mentre quelli provenienti dall'Isola d'Elba sono risultati positivi a *B.microti* e *B.divergens*. (Tab. 3)

Procedendo con l'analisi delle sequenze e andando a costruire un albero filogenetico utilizzando la matrice di distanza fornita dall'allineamento di ClustalX visualizzata con il programma NJplot, vengono evidenziati per gli animali selvatici 5 gruppi principali. (Fig. 13)

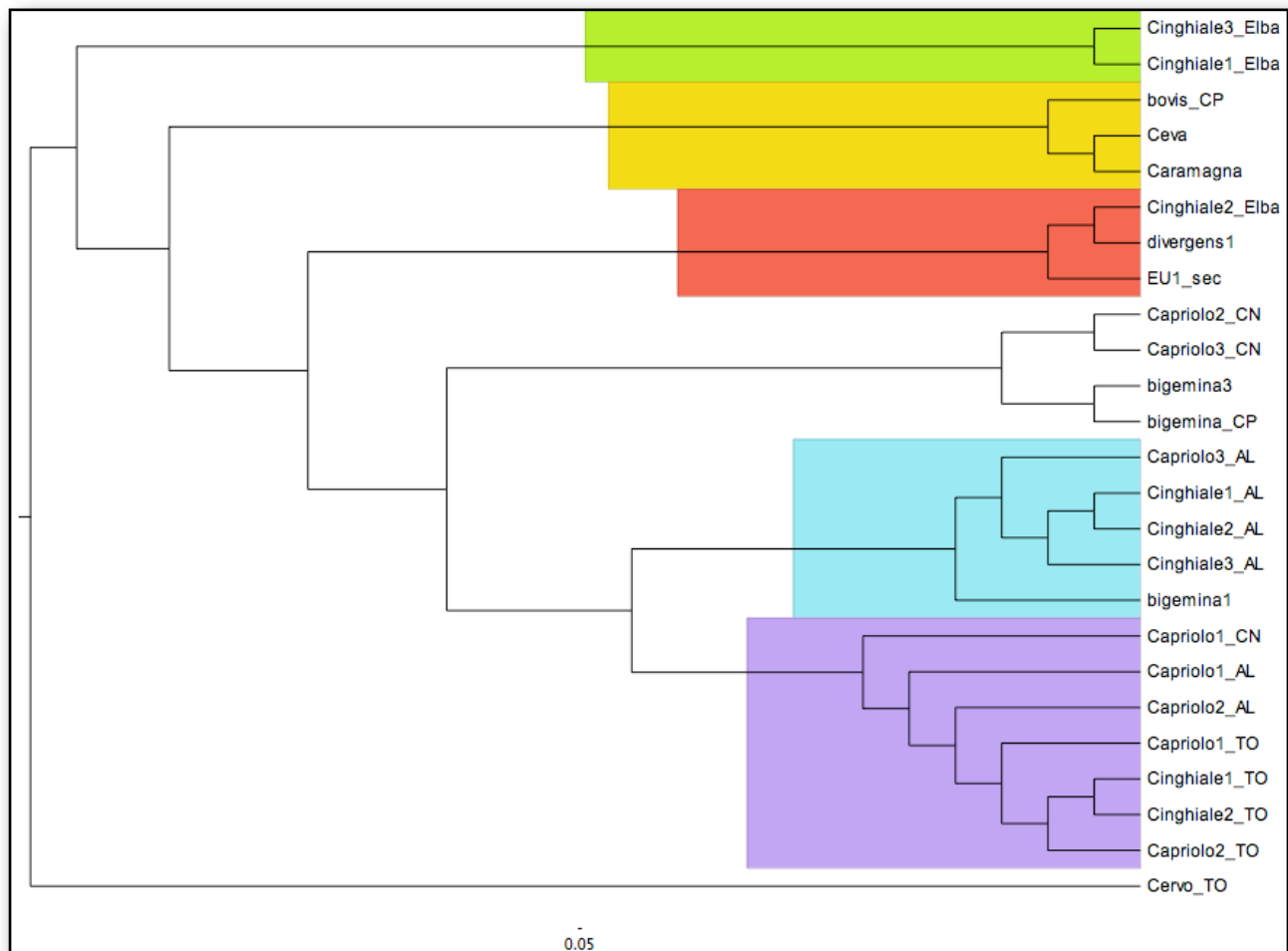


Fig. 13: Albero filogenetico visualizzato con programma NJplot

Sostanzialmente viene messo in evidenza come i 4 gruppi di *B.bigemina* siano diversi tra loro: principalmente il gruppo che proviene dall'Isola d'Elba, evidenziato in verde, risulta distinguibile da quelli presenti nella regione Piemonte, che a loro volta possono essere distinti in un gruppo evidenziato di azzurro, che comprende tutti animali provenienti dalla provincia di Alessandria, un gruppo che comprende solo caprioli della provincia di Cuneo, non evidenziato da alcun colore, e un ultimo grande gruppo, evidenziato con il colore viola, più eterogeneo, in quanto comprende animali provenienti dalle tre provincie



piemontesi. Da evidenziare come la sequenza di *B. divergens* denominata “Cinghiale2\_Elba” sia molto vicina filogeneticamente alla sequenza del ceppo denominato EU1, che è responsabile dei casi di babesiosi umana in Europa.

Variando il tipo di analisi filogenetica applicata ed utilizzando il sistema del neighbour-joining, che non considera semplicemente la distanza tra le coppie ma valuta anche la distanza rispetto a tutti gli altri punti, mettendo in questo modo maggiormente in evidenza le differenze, possiamo osservare come i ceppi presenti tra i cinghiali, pur essendo vicini a quelli presenti nei caprioli delle stesse zone, risultino maggiormente distinti da questi ultimi e potrebbero derivare, per quel che riguarda il gruppo della provincia di Alessandria, dall’adattamento del ceppo presente nella zona a questo ospite. (Fig. 14)

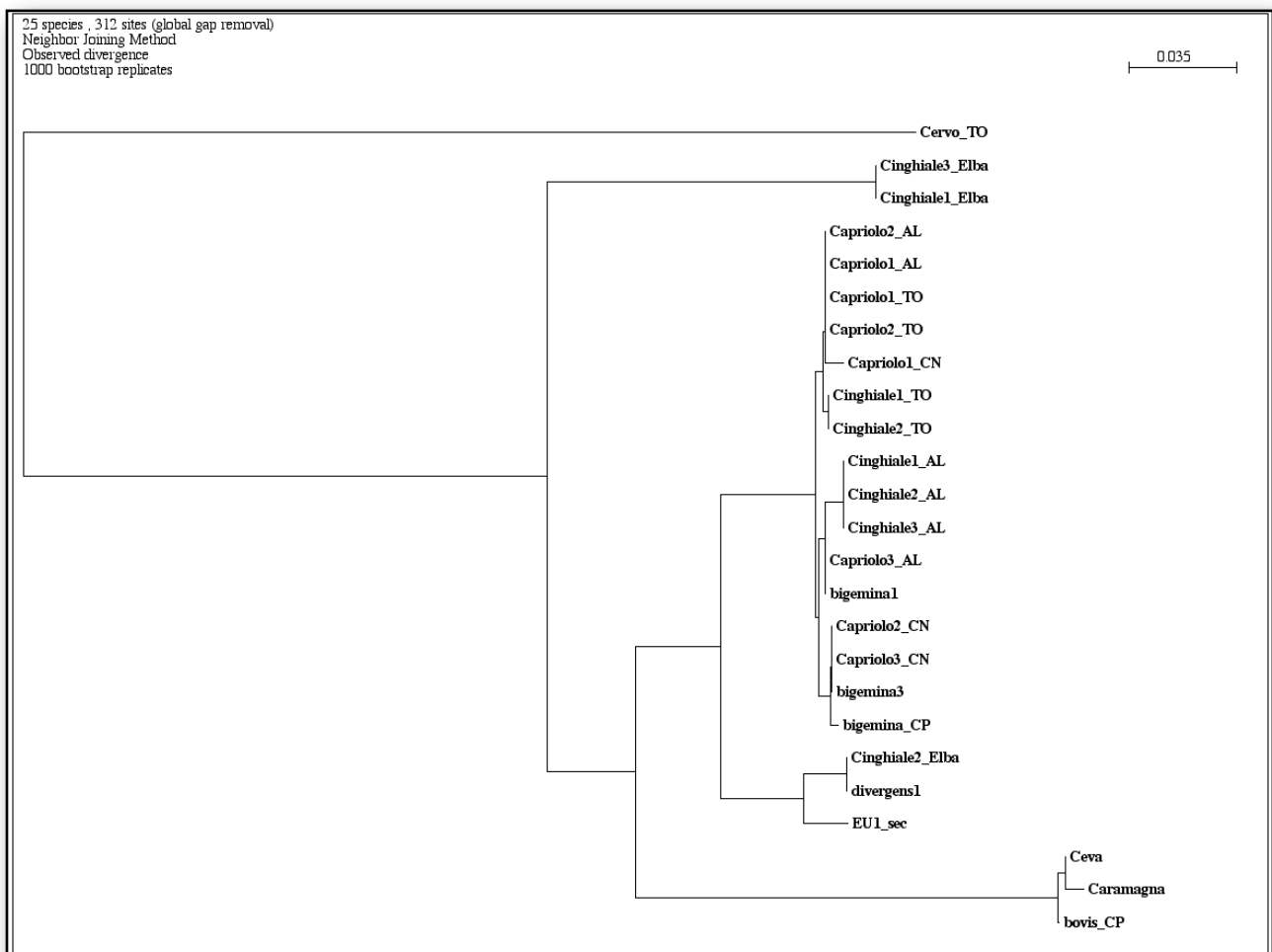


Fig. 14: Albero Filogenetico costruito con il metodo del neighbour-joining

## Conclusione generale

Al momento il mosaico della babesiosi è ancora in via di costruzione, soprattutto perchè sono ancora in via di definizione molti aspetti necessari a valutarne chiaramente il ciclo silvestre. In questa direzione sarebbe necessario in futuro continuare l'indagine in quelle zone dove si sono ritrovate nei selvatici quelle specie di *Babesia* che sono segnalate nei bovini per chiarire se ci sia un'intersezione tra il ciclo nei selvatici e nei domestici che condividano le medesime aree di pascolo.

Bisogna anche considerare che non è ancora del tutto chiaro quali specie di *Babesia* siano responsabili di malattia nell'uomo e soprattutto quali ospiti vertebrati fungano da serbatoio e quali specie di zecche da vettori. Di fatto il presente lavoro ha sicuramente aggiunto una tessera, permettendoci di andare ad aggiungere alla distribuzione sul territorio italiano le specie di *Babesia* che abbiamo riscontrato e colmando una lacuna non indifferente.

Sebbene il rischio attuale per la sanità umana appaia relativamente basso, occorre comunque segnalare che la circolazione della variante EU1 tra gli animali selvatici possa essere in realtà sottostimata e quindi da tenere in considerazione negli studi futuri.





# Bibliografia

AA.VV. (1993). Hematology: Principles and Procedures. Philadelphia, Brown AB.

Alhassan, A., W. Pumidonming, et al. (2005). "Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood." Vet Parasitol **129**(1-2): 43-49.

Allsopp, M. T. and B. A. Allsopp (2006). "Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species." Ann N Y Acad Sci **1081**: 509-517.

Babes, V. (1888). "Sur l'hémoglobinurie bactérienne du boef." Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences **107**: 692-694.

Bakheit, M. A., U. Seitzer, et al. (2007). "Serological diagnostic tools for the major tick-borne protozoan diseases of livestock." Parassitologia **49 Suppl 1**: 53-62.

Bekker, C. P., S. de Vos, et al. (2002). "Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization." Vet Microbiol **89** (2-3): 223-238.

Birkenheuer, A. J., M. G. Levy, et al. (2003). "Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples." J Clin Microbiol **41**(9): 4172-4177.

Brigido, C., I. P. da Fonseca, et al. (2004). "Molecular and phylogenetic characterization of *Theileria* spp. parasites in autochthonous bovines (Mirandesa breed) in Portugal." Vet Parasitol **123**(1-2): 17-23.

Centeno-Lima, S., V. do Rosario, et al. (2003). "A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis." Trop Med Int Health **8**(8): 760-764.

Comazzi, S., S. Paltrinieri, et al. (1999). "Diagnosis of canine babesiosis by Percoll gradient separation of parasitized erythrocytes." J Vet Diagn Invest **11**(1): 102-104.

Comazzi, S., C. Pieralisi, et al. (2004). "Haematological and biochemical abnormalities in canine blood: frequency and associations in 1022 samples." J Small Anim Pract **45** (7): 343-349.

- Costa-Junior, L. M., E. M. Rabelo, et al. (2006). "Comparison of different direct diagnostic methods to identify *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in animals vaccinated with live attenuated parasites." Vet Parasitol **139**(1-3): 231-236.
- Criado-Fornelio, A. (2007). "A review of nucleic-acid-based diagnostic tests for *Babesia* and *Theileria*, with emphasis on bovine piroplasms." Parassitologia **49 Suppl 1**: 39-44.
- Criado-Fornelio, A., M. A. Gonzalez-del-Rio, et al. (2004). "The "expanding universe" of piroplasms." Vet Parasitol **119**(4): 337-345.
- Dalrymple, B. P. (1990). "Cloning and characterization of the rRNA genes and flanking regions from *Babesia bovis*: use of the genes as strain discriminating probes." Mol Biochem Parasitol **43**(1): 117-124.
- Donatien, A. and F. Lestoquard (1930). "De la classification des piroplasmes des animaux domestiques." Recueil de Medecine Veterinaire Exotique **3**: 5-20.
- Fahrimal, Y., W. L. Goff, et al. (1992). "Detection of *Babesia bovis* carrier cattle by using polymerase chain reaction amplification of parasite DNA." J Clin Microbiol **30**(6): 1374-1379.
- Felsenstein, J. (1981). "Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach." J Mol Evol **17**(6): 368-376.
- Fitch, W. M. (1971). "Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology." Systematic Zoology **20**: 406-416.
- Galtier, N., M. Gouy, et al. (1996). "SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny." Comput Appl Biosci **12**(6): 543-548.
- Gelfand, J. A. and M. V. Callahan (2003). "Babesiosis: An Update on Epidemiology and Treatment." Curr Infect Dis Rep **5**(1): 53-58.
- Gubbels, J. M., A. P. de Vos, et al. (1999). "Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization." J Clin Microbiol **37**(6): 1782-1789.

- Herwaldt, B. L., S. Caccio, et al. (2003). "Molecular characterization of a non-Babesia divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe." Emerg Infect Dis **9**(8): 942-948.
- Hurkova, L. and D. Modry (2006). "PCR detection of Neospora caninum, Toxoplasma gondii and Encephalitozoon cuniculi in brains of wild carnivores." Vet Parasitol **137** (1-2): 150-154.
- Kaufhold, A., A. Podbielski, et al. (1994). "Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes." FEMS Microbiol Lett **119**(1-2): 19-25.
- Kibe, M. K., O. K. ole-MoiYoi, et al. (1994). "Evidence for two single copy units in Theileria parva ribosomal RNA genes." Mol Biochem Parasitol **66**(2): 249-259.
- Kjemtrup, A. M. and P. A. Conrad (2000). "Human babesiosis: an emerging tick-borne disease." Int J Parasitol **30**(12-13): 1323-1337.
- Krause, P. J., K. McKay, et al. (2002). "Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease." Clin Infect Dis **34**(9): 1184-1191.
- Krause, P. J., A. Spielman, et al. (1998). "Persistent parasitemia after acute babesiosis." N Engl J Med **339**(3): 160-165.
- Levine, N. (1971). "Taxonomy of the piroplasms." Trans. Amer. Microscop. Soc. **90**: 2-33.
- Melhorn, H. and E. Schein (1984). The piroplasms: life-cycle and sexual stages, Academic Press. London.
- Meliani, P., S. Khatibi, et al. (2006). "[Human babesiosis]." Med Mal Infect **36**(10): 499-504.
- Oura, C. A., R. P. Bishop, et al. (2004). "Application of a reverse line blot assay to the study of haemoparasites in cattle in Uganda." Int J Parasitol **34**(5): 603-613.
- Penzhorn, B. L. (2006). "Babesiosis of wild carnivores and ungulates." Vet Parasitol **138** (1-2): 11-21.
- Perriere, G. and M. Gouy (1996). "WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks." Biochimie **78**(5): 364-369.

- Pietrobelli, M., G. Cancrini, et al. (2007). "Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy?" Parassitologia **49 Suppl 1**: 33-38.
- Prichard, R. and A. Tait (2001). "The role of molecular biology in veterinary parasitology." Vet Parasitol **98**(1-3): 169-194.
- Rijpkema, S. G., M. J. Molkenboer, et al. (1995). "Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes." J Clin Microbiol **33**(12): 3091-3095.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.
- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol. Biol. Evol. **4**: 406-425.
- Sambri, V., A. Marangoni, et al. (2004). "[Tick borne zoonosis: selected clinical and diagnostic aspects]." Parassitologia **46**(1-2): 109-113.
- Schettters, T. P., J. A. Kleuskens, et al. (2009). "Systemic inflammatory responses in dogs experimentally infected with *Babesia canis*; a haematological study." Vet Parasitol **162**(1-2): 7-15.
- Schnittger, L., H. Yin, et al. (2004). "Simultaneous detection and differentiation of *Theileria* and *Babesia* parasites infecting small ruminants by reverse line blotting." Parasitol Res **92**(3): 189-196.
- Sholtens, Braff, et al. (1968). "A case of babesiosis in man in the United States." Am J Trop Med Hyg **17**: 810-813.
- Skrabalo, Z. and Z. Deanovic (1957). "Piroplasmosis in man; report of a case." Doc Med Geogr Trop **9**(1): 11-16.
- Smith, T. and F. L. Kilborne (1893). "Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever." 8th and 9th Records of the Bureau of Animal Industry, U.S. Department of Agriculture: 177-304.

- Tait, A. and C. Oura (2004). "Reverse line blotting: a new technique for the sensitive detection of tick borne pathogens." Arch Inst Pasteur Tunis **81**(1-4): 47-50.
- Torina, A. and S. Caracappa (2007). "Babesiosis in Italy: an overview." Parassitologia **49** **Suppl 1**: 23-28.
- Uilenberg, G. (2004). "[Microscopic diagnosis of tick-borne diseases in Maghreb]." Arch Inst Pasteur Tunis **81**(1-4): 35-40.
- Uilenberg, G. (2006). "Babesia--a historical overview." Vet Parasitol **138**(1-2): 3-10.
- Vannier, E. and P. J. Krause (2009). "Update on babesiosis." Interdiscip Perspect Infect Dis **2009**: 984568.
- Wilson and Chowing (1904). "Studies in Pyrosoma hominis." J. Infect. Dis. **1**: 37-57.
- Zahler, M., H. Rinder, et al. (2000). "'Babesia gibsoni' of dogs from North America and Asia belong to different species." Parasitology **120** ( Pt 4): 365-369.
- Zintl, A., G. Mulcahy, et al. (2003). "Babesia divergens, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance." Clin Microbiol Rev **16**(4): 622-636.



# Percorso Formativo

## Programma Formativo I anno

- Didattica Comune Scuola XII Ciclo (svolta e superata con la votazione di 19/20)
- Partecipazione al “Second *Babesia* World Summit”, tenutosi a Palermo, presso l’IZS della Sicilia “A. Mirri”, 4 e 5 maggio 2007.

## Pubblicazioni ISI

Ferroglio E., Pasino M., **Romano A.**, Grande D., Pregel P., Trisciunglio A., Evidence of *Neospora caninum* DNA in wild rodents. *Vet Parasitol.* 2007 Sep 30;148(3-4):346-9.

## Programma Formativo II anno

- Didattica Caratterizzante:
  - Strumenti per l'analisi delle risorse genetiche (Prof. Sacchi)
  - Neurologia degli animali da reddito (Prof. D'Angelo)
  - Principali problematiche sanitarie dell'allevamento in aree tropicali e subtropicali, con particolare riferimento a zecche e malattie trasmesse in Africa (Dott. De Meneghi)
  - Applicazione di nuovi metodi di biologia molecolare allo studio della parassitologia: stato dell'arte e sviluppi futuri (Prof. Ferroglio)
  - Utilizzo di farmaci negli animali in produzione zootecnica e residui di farmaci nelle derrate di origine animale (Dott. Odore)
  - Neuropatologia degli animali da reddito (Dott. Capucchio)
  - Principi e problematiche zootecniche in ambito tropicale e sub-tropicale, con particolare riferimento all'Africa sub-sahariana (Dott. Mattoni)
- Partecipazione al "XXV Congresso Nazionale SOIPA" Pisa, 18-21 giugno 2008, con la presentazione dei poster:
  - Quantitative Real-Time PCR protocol for the diagnosis of canine leishmaniasis. Ferroglio, Calabrese, **Romano**, Poggi, Rivò, Trisciuglio. Parassitologia, pag 13, 50, 1-2 (suppl.) 2008
  - Distribution of *Phlebotomus perniciosus*: a study on 18S of phlebotomine sandflies. **Romano**, Dettoni, Trisciuglio, Ferroglio. Parassitologia, pag 138, 50, 1-2 (suppl.) 2008
- Presentazione al "8th Biennial Conference of EWDA, Croazia, 2-5 ottobre 2008 del poster:
  - *Leishmania infantum* in foxes from the Province of Imperia (north-west Italy). Ferroglio, Mignone, **Romano**, Caroggio, Poggi and Trisciuglio.

## **Pubblicazioni ISI**

Sobrino R., Ferroglio E., Oleaga A., **Romano A.**, Millan J., Revilla M., Arnal MC., Trisciuglio A., Gortázar C. Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*. 155 (2008) 198–203.

**Romano, A.**, Trisciuglio, A., Grande, D., Ferroglio, E., Comparison of two PCR protocols for the detection of *Neospora caninum* DNA in rodents, *Veterinary Parasitology*. 159 (2009) 159–161.

## Programma Formativo III anno

- Programma di internazionalizzazione svolgere presso l'IREC (Istituto de Investigacion en Recursos Cinegeticos), Ciudad Real, Spagna, sotto la supervisione del Prof. Christian Gortazar Schmidt.

- Partecipazione al "III Congresso Nazionale di Ecopatologia della Fauna Selvatica", Torino, 15/17 ottobre 2009, con la comunicazione orale:

- Diffusion of piroplasms between reo deer (*Capreolus capreolus*) and wild board (*Sus scofa*) in the north of Italy. **Romano A.**, Grande D., Tomassone L. and Ferroglio E.

Presentazione del poster :

- Biomolecular investigation of the presence of *E. cuniculi* in Piedmont (North West Italy). **Romano A.**, Palese V., Grande D. And Ferroglio E.

### Pubblicazioni ISI

Biglino A., Bolla C., Concialdi E., Trisciuglio A., **Romano A.**, Ferroglio E. Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in a traditionally non-endemic area of North-western Italy (Piemonte region). Journal Clinical Microbiology. 2009 Nov 18. [Epub ahead of print] PMID: 19923480