

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA VETERINARIA**

**A CICLO UNICO**

TESI DI LAUREA

**INDAGINI SULLA INFEZIONE DA BORNA VIRUS IN  
EQUINI DELLE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E  
BOLZANO**

**RELATORE : PROF. MARCO MARTINI**

**CORRELATORE: DOTT. STEFANO GENERO**

**LAUREANDA: ELISA STEFANI**

ANNO ACCADEMICO 2010-2011



## RINGRAZIAMENTI

*Si ringraziano il Prof. Marco Martini dell'Università di Medicina Veterinaria degli Studi di Padova, il Dott. Stefano Genero, la Dott.ssa Paola De Benedictis, Crispina Veggiato, il Dott. Calogero Terregino e il personale della sezione di Virologia Speciale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro). Il Dott. Gian Luca Autorino, Dott. Marcello Sala, Dott.ssa Teresa Sicluna del Centro di Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana. Il Dott. Giovanni Farina e il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Trento. La Dott.ssa Dorotea Lombardo e il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Bolzano.*



## INDICE

<b>CAPITOLO I: INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1 La malattia di Borna	1
1.2 Eziologia	1
1.2.1 Classificazione	1
1.2.2 Replicazione	5
1.3 Epidemiologia	6
1.3.1 Distribuzione geografica	6
1.3.1.1 BDV infezione nella popolazione equina Italiana	7
1.3.1.2 Epidemiologia Molecolare	9
1.3.2 Spettro d'ospite	14
1.3.3 Via di trasmissione	19
1.4 Patogenesi	23
1.4.1 Neuroinvasione e propagazione	23
1.5 Sintomatologia	28
1.5.1 Infezione naturale	28
1.5.2 Infezione sperimentale	32
1.6 Lesioni anatomo-istopatologiche	35
1.7 Profilassi e Terapia	36
1.8 Infezione nell'uomo	38
1.9 Diagnosi	43
1.9.1 Intra vitam	43
1.9.2 Post mortem	44
<b>CAPITOLO II: OBIETTIVI DEL LAVORO</b>	<b>46</b>
<b>CAPITOLO III: MATERIALI E METODI</b>	<b>47</b>
3.1 Campionamento	47
3.1.1 Criteri di selezione degli equidi testati	48
3.2 Sierologia	50
3.2.1 Immunofluorescenza indiretta (IFA)	51
<b>CAPITOLO IV: RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>59</b>
<b>ALLEGATI</b>	<b>73</b>

# ***CAPITOLO I: INTRODUZIONE***

---

## **1.1 LA MALATTIA DI BORNA**

BDV è l'agente eziologico della malattia di Borna (BD). Questa patologia si manifesta attraverso una forma di encefalomyelite che colpisce principalmente cavalli e pecore. La zona endemica comprende soprattutto alcune zone della Germania, alcune aree della valle del Reno nel territorio svizzero, Austria e Principato del Liechtenstein. Tra il 1894 e il 1896 una grande epidemia di BDV si verificò tra i cavalli dell'esercito nella città di Borna, nello stato della Sassonia (Germania). La malattia e il suo agente virale prendono il nome dal luogo di questo primo grande focolaio (Dürwald R. & Ludwig H. 1997; Gwenaëlle D. *et al* 2002).

A partire da quegli anni, per arrivare fino ad oggi, la malattia ha assunto un andamento endemico con decine di segnalazioni annue. A seguito di una prima relazione in cui si sospettò che BDV o virus ad esso correlati potessero essere associati a disturbi psichiatrici dell'uomo, le questioni riguardanti l'epidemiologia di BDV divennero di interesse comune per molti virologi medici e veterinari. Prove accumulate hanno indicato che le infezioni da BDV potrebbero verificarsi in tutto il mondo in diverse specie di vertebrati, compresi gli esseri umani, e i primi studi di *follow-up* sembrano confermare il legame tra BDV e alcune malattie mentali umane. La questione se BDV sia da considerarsi una sospetta zoonosi, e la possibilità di una sua distribuzione mondiale, è altamente controversa e il dibattito è tutt'ora in corso (Staehele P. *et al* 2000).

## **1.2 EZIOLOGIA**

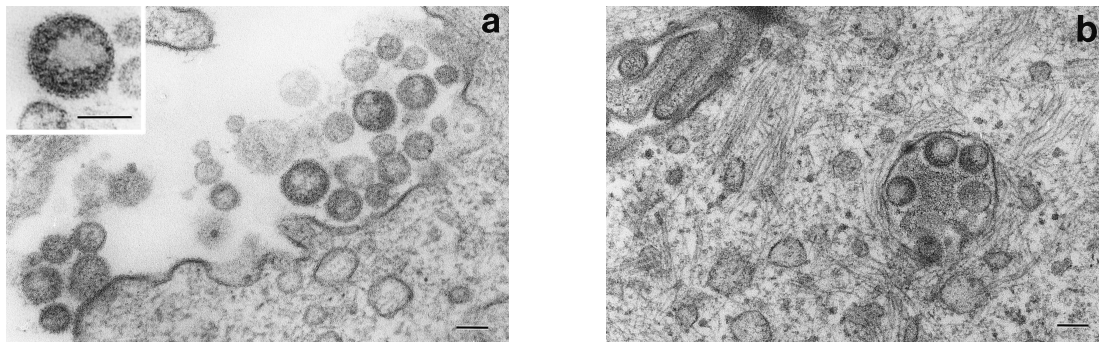
### **1.2.1 CLASSIFICAZIONE**

Il *Virus della malattia di Borna* (BDV) è un virus dotato di *envelope*, ad RNA, non segmentato, a polarità negativa, che trascrive e replica il genoma in sede nucleare, privo di potere citopatico e con spiccato neurotropismo replica primariamente nei neuroni e successivamente nelle cellule della glia; classificato come virus prototipo della nuova

famiglia di costituzione delle *Bornaviridae*, appartiene all'ordine *Mononegavirales* (Staeheli P. *et al* 2000).

L'ordine *Mononegavirales* comprende anche le famiglie: *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* e *Paramyxoviridae*.

I *Rhabdovirus* hanno aspetto di proiettile, i *Filovirus* sono virus filamentosi e i *Paramyxovirus* sono pleomorfi. Benché il genoma del virus sia simile a quello dei *Rhabdovirus*, alcuni studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che le particelle virali hanno forma sferica con diametro compreso tra i 100 e 130 nm e con un core elettrondenso di circa 50-60 nm delimitato da una membrana pericapsidica (*envelope*) di 4 nm di spessore che si presenta circondata da proiezioni di 7 nm di lunghezza (fig.1) (Kohono T. *et al* 1999; Richt J. & Rott R. 2001).

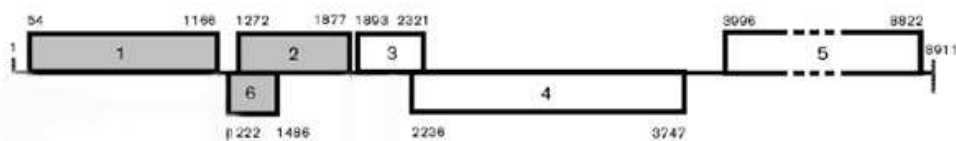


**Fig.1** Sezione ultrasottile di cellule MDCK infette da BDV. (a) particella virale extracellulare ad alta magnificazione; (b) particella virale nel vacuolo citoplasmatico. Bars 100nm (Kohono T. *et al* 1999 modificata).

Il genoma virale consiste di una singola molecola di RNA non segmentato (NNS) a polarità negativa ed è costituito da 8910 nucleotidi (8.9 Kb), quindi è molto compatto se comparato con gli altri virus RNA NNS (da 11 a 15 Kb). Il genoma ha sei ORFs maggiori (*Open Reading Frame*), che codificano per le proteine p40, p24, p10, (g)p16, p56 e p180 (Fig.2). In considerazione delle regioni del genoma dove vengono codificate, della loro massiccia presenza sia nelle cellule infette che nelle particelle virali, unitamente alle loro proprietà biochimiche e alle sequenze che le caratterizzano, le proteine p40, p24 e p16 corrisponderebbero, rispettivamente, alla nucleoproteina virale (NP), alla fosfoproteina (P) attivatrice del processo di trascrizione e alla proteina di matrice (M). Le stesse evidenziabili in altri virus RNA NNS. Due isoforme della proteina NP (p40 e p38) sarebbero state anch'esse evidenziate nelle cellule infette con BDV e sembrerebbe che la

loro espressione derivi da due diversi tipi di RNAm, oppure da una capacità differenziale codificante da parte di codoni che costituiscono il gene p40 del virus. La proteina p16, o proteina M, a differenza degli altri virus RNA NNS, in BDV si presenta glicosilata. E' localizzata nell'envelope e dovrebbe essere coinvolta nel processo di adsorbimento del virus alla cellula. Per quanto concerne la proteina p56, a giudicare dall'organizzazione delle sue sequenze, dovrebbe corrispondere alle glicoproteine superficiali (G) come presenti negli altri componenti del gruppo dei virus con RNA NNS. In realtà, il gene p56 è responsabile della sintesi di due polipeptidi glicosilati, GP-84/94 e GP-43. Gli anticorpi indotti dalla proteina p56 hanno attività neutralizzante, pertanto i prodotti del gene p56 rivestono un ruolo importante nelle fasi precoci dell'infezione sostenuta da BDV. Il gene p180 esprime la sintesi di un'altra proteina, la p190, che assieme alla p24 formerebbero un complesso polimerasi (Luo M. *et al* 2007; Richt J. & Rott R. 2001).

La proteina p10 o X regola l'attività polimerasica e sembra essere essenziale per la moltiplicazione virale (Poenisch M. *et al* 2007; Walker P. *et al* 1995).

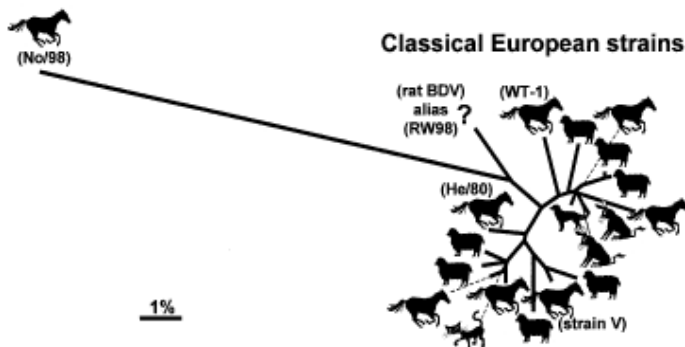


**Fig. 2** BDV; ORF che codificano per le diverse proteine: 1 (nucleoproteina), 2 (fosfoproteina), 3 (proteina di matrice), 4 (glicoproteina dell'envelope), 5 (RNA polimerasi RNA dipendente) e 6 (proteina X) (Kolodziejek J. *et al* 2005 modificata).

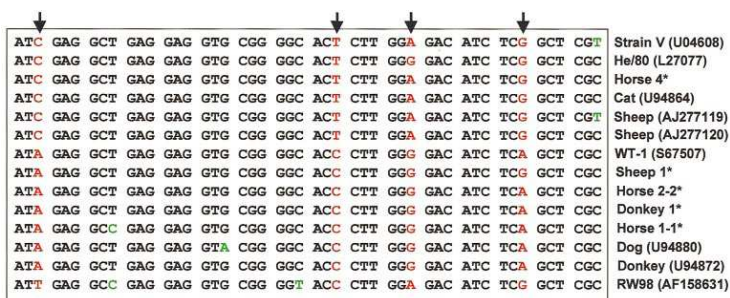
Nel 1996, durante l'*International Congress of Virology*, la famiglia *Bornaviridae* è stata creata appositamente per BDV in quanto esso si presenta con caratteri unici. E' l'unico virus RNA NNS che ha sede di replicazione e trascrizione nucleare (caratteristica che ne favorisce la persistenza all'interno del SNC), è anche caratterizzato da neurotropismo privo di potere citolitico, basso tasso di replicazione e persistenza nel SNC. Altra particolarità è la capacità di attraversare lunghissimi periodi di latenza e brevi periodi di attivazione che si alternano per tutta la durata della vita dell'ospite. Infine, a differenza della maggior parte degli altri RNA virus, il genoma di BDV sembra apparire estremamente stabile nel tempo, nello spazio (diverse aree geografiche) e nelle varie specie. Secondo la maggior parte degli autori il genoma di BDV rimane stabile anche dopo centinaia di passaggi seriali (Codazza D. & Nativi D. 2005).



Diversi ceppi di BDV sono stati isolati da cavalli infetti, pecore e altri animali, e le loro sequenze sono state in parte o completamente determinate. Le sequenze del genoma di frammenti di BDV amplificati mediante RT-PCR dall'encefalo di cavalli, pecore, asini, cani e gatti sono stati pubblicati e depositati in *EMBL/database GenBank*. Parte di queste informazioni sono state usate per costruire l'albero filogenetico mostrato in (Fig.3), che si basa sulla sequenza del frammento nucleotidico del gene p24 (proteina P). Questo confronto ha rivelato che la maggior parte dei ceppi sono altamente correlati tra loro e presentano differenze genomiche inferiori al 5%. Curiosamente, le mutazioni nucleotidiche nel genoma dei ceppi europei classici di BDV non sono distribuiti casualmente (Fig.4). Sembra probabile che alcuni vincoli funzionali non riconosciuti tra cui strutture secondarie o terziarie di RNA limitino le alterazioni nella sequenza in alcuni punti. In alternativa, la distribuzione non casuale di scambi di base nel genoma di ceppi europei comuni di BDV potrebbe semplicemente indicare la comune provenienza da gruppi di cellule progenitrici geneticamente stabili (Binz T. *et al* 1994; Staeheli P. *et al* 2000).



**Fig.3** Albero filogenetico dei ceppi di campo BDV. L'albero si basa su sequenze di nucleotidi (aminoacidi 71-181) che codificano per la proteina P. Si noti che tutti i ceppi europei classici sono strettamente legati, anche se provenienti da specie diverse. Si noti anche la posizione remota nell'albero filogenetico del ceppo No/98 isolato da un pony della Stiria (Austria). (Binz T. *et al* 1994 modificata)



**Fig.4** Distribuzione non casuale degli scambi di nucleotidi nei ceppi europei classici di BDV. Viene mostrato un breve tratto di sequenza virale (nucleotidi 1533-1580) del gene p24. Le posizioni in cui lo scambio di nucleotidi sono state osservate più frequentemente sono contrassegnate dalle frecce e dal colore rosso. Per ragioni sconosciute, le mutazioni in queste posizioni sono altamente preferite. Modelli analoghi di mancato scambio di nucleotidi casuali sono stati osservati anche in altre parti del genoma virale (Binz T. *et al* 1994 modificata).

Dall'ulteriore confronto delle sequenze è emerso che i ceppi BDV provenienti da varie specie ospiti sembrano mancare di specificità. Virus isolati da cavalli, non mostrano un

elevato grado di diversità da quello isolato da pecore, asini o altri ospiti (Fig.3). Poiché in ogni cluster di infezione documentato, sembra essere coinvolta una sola specie alla volta, come ad esempio il cavallo o la pecora, l'assenza di pattern genetici riconducibili all'adattamento alla specie ospite è inaspettata. Poiché questo non è stato osservato, i dati sembrano puntare verso una singola fonte da cui i vari animali di allevamento acquisiscono il virus. Questo sosterrrebbe l'ipotesi che soggetti persistentemente infetti o alcuni insettivori selvatici (*Crocidura leucodon*) possano fungere da serbatoio per il virus, e che gli animali potrebbero contrarre l'infezione da mangimi che sono contaminati con l'urina di tali animali infetti (Hilbe M. *et al* 2006).

### 1.2.2 REPLICAZIONE

Secondo alcuni autori (Bode L. & Ludwig H. 2003; Carbone K. *et al* 1987; Durrwald R. *et al* 2006; Kohono T. *et al* 1999) la penetrazione del virus nella cellula avviene per endocitosi mediata da recettori di cui non si conosce ancora l'esatta identità. Nel processo appaiono coinvolte anche le proteine G ed M. Negli endosomi l'ambiente acido favorisce la fusione fra l'*envelope* del virus e la membrana cellulare, dopodiché le proteine ribonucleiche (RNP) del virus vengono rilasciate nel citoplasma e trasportate nel nucleo della cellula dove avviene la trascrizione e la replicazione. Le cellule infettate con BDV presentano un comportamento piuttosto eterogeneo nell'esprimere gli antigeni virali. A questo proposito, le proteine NP, P e p10 vengono espresse nel nucleo e nel citoplasma e sono gli antigeni virali sintetizzati alle concentrazioni più elevate dalla maggior parte delle cellule infette, mentre nel caso della proteina G, solo una percentuale variabile da una a dieci delle cellule infette risultano in grado di produrla. L'espressione a tutta lunghezza della proteina G (GP 84/94) si realizza soprattutto sulla membrana nucleare e sul reticolo endoplasmatico. Ancora non è nota la distribuzione della proteina M nell'ambito della cellula infetta, mentre è stato rilevato che questa proteina, unitamente alla proteina G, viene glicosilata dopo la trascrizione. Anche le informazioni sulla maturazione (acquisizione dell'*envelope*) non sono ancora chiare, mentre la sua fuoriuscita dalla cellula per gemmazione è stata osservata soltanto sulla membrana cellulare di cellule MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) in seguito al trattamento delle cellule con n-butirrato. I ribonucleocapsidi di BDV si accumulano nel nucleo e, alla stessa stregua di quanto si osserva nel caso di altri virus con genoma RNA NNS, anch'essi risultano infettati a giudicare dalla loro accertata capacità di indurre le sintesi macromolecolari virali, come

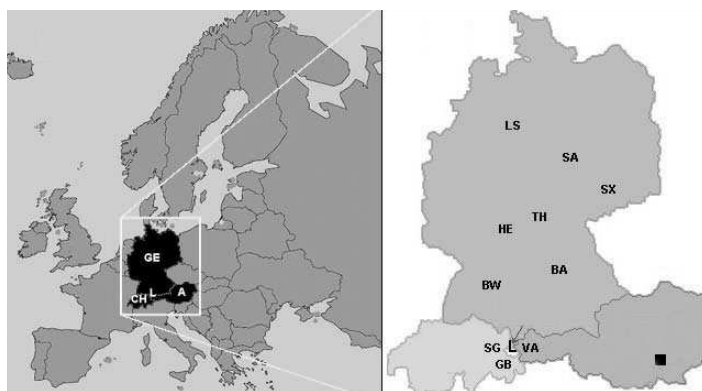
pure dalla loro capacità di produrre BDV infettante associato alle cellule in seguito a transfezione di cellule recettive al virus. L'osservazione di sezioni ultrasottili di cellule infette consente il rilievo in sede citoplasmatica di particelle simil-virali con caratteristiche morfologiche simili a quelle tipiche dei virioni infettanti di BDV al di fuori della cellula. Le suddette particelle non risultano associate alle cisterne del reticolo endoplasmatico, né dell'apparato di Golgi e a nessun'altra membrana intracitoplasmatica (Ackermann A *et al* 2007; Bajramovic J. *et al* 2003; Castrucci G. 2002).

## **1.3 EPIDEMIOLOGIA**

### 1.3.1 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Anche se l'infezione di BDV è stata per anni descritta solo in cavalli e ovini e alcuni animali selvatici (ad esempio conigli) delle zone tedesche, con l'avvento dei più moderni strumenti per la diagnosi di infezioni da BDV (quali ad esempio l'ibridazione in situ e la [RT-PCR]) e con il crescere dell'interesse della ricerca internazionale, i rapporti di specie sensibili e le aree geografiche di casi di infezione naturale sono aumentati. Animali a rischio di infezione naturale o sperimentale comprendono scimmie rhesus e macaca fuscata, cavalli, pecore, bovini, capre, conigli, daini, lama, alpaca, gatti, ratti, topi, insettivori (*Crocidura leucodon*), gerbilli, procioni, cani, struzzi e specie aviari dell'ordine psittaciformi. La ricerca e il ritrovamento di anticorpi specifici per BDV, sia in sieri equini che umani, evidenziano inoltre che l'infezione naturale sia diffusa oltre i confini dell'Europa centrale con segnalazioni in: Francia, Polonia, Svezia, Finlandia, Regno Unito, Israele, Giappone, Australia, Stati Uniti, Iran, Taiwan, Bangladesh (Bode L. & Ludwig H. 2000; Durrwald R. *et al* 2006; Hagiwara K *et al* 2001; Kolodziejek J. *et al* 2005); anche se nei cavalli australiani è stata riscontrata una bassa prevalenza di *marker* di infezione, che non permette di parlare di diffusione endemica di BDV (Kamhieh S. *et al* 2005). In Italia solo ultimamente si sta prendendo atto dell'esistenza della BD (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Nelle aree endemiche per BDV (Fig.5) del centro Europa figurano la Germania (con distinte regioni al suo interno: stati federali di Baviera, Baden-Wurtemberg, Assia, Bassa Sassonia, Sassonia-Anhalt, Sassonia e Turingia), la parte orientale della Svizzera (cantoni Grigioni e Sankt Gallo), il Principato del Liechtenstein, e lo stato federale più occidentale d'Austria (Vorarlberg) (Kolodziejek J. et al/ 2005).



**Fig.5** Carta dell'Europa in cui sono evidenziati i quattro paesi con zone endemiche per BDV. A sinistra: A per L'Austria, CH per la Svizzera, GE per la Germania, L per Liechtenstein. A destra un ingrandimento di queste quattro aree: BA Bavaria, BW Baden-Wuerttemberg, GB Graubuenden, HE Hesse, L Liechtenstein, LS Lower Saxony, SA Saxony-Anhalt, SG Sankt Gallen, SX, Saxony, TH Thuringia, VA Vorarlberg. Il quadrato indica la zona dove è stato isolato il sottotipo No/98 (nello Stato Federale della Stiria) (Kolodziejek J. et al 2005).

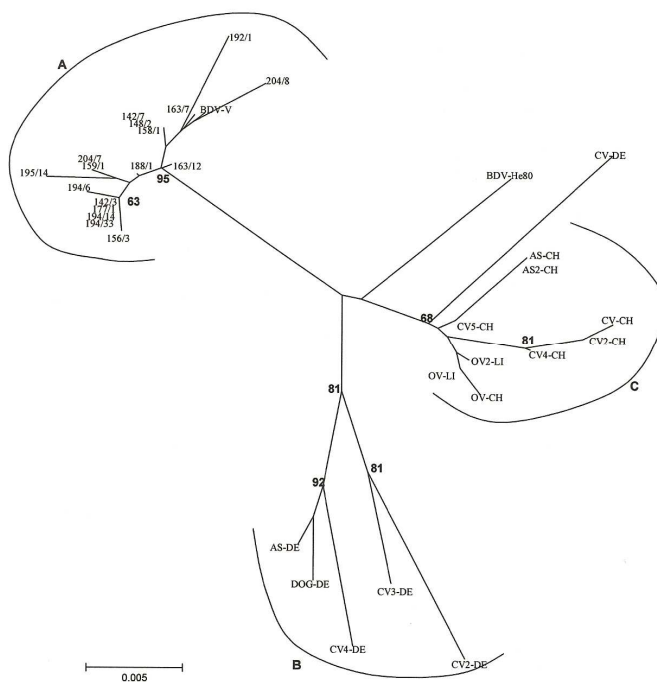
### 1.3.1.1 BDV INFEZIONE NELLA POPOLAZIONE EQUINA ITALIANA

In Italia non sono state svolte molte indagini circa la sieroprevalenza per Borna negli equidi. Uno degli studi a cui riferirsi per valutare lo stato attuale in Italia è stato condotto da Codazza e collaboratori: sono stati testati 708 sieri equini provenienti da varie regioni d'Italia (Nord, Est e Centro), distribuiti per classe altitudinale, età e sesso. La suddivisione in classi è stata effettuata sulla base dell'attitudine dei cavalli testati: cavalli semiselvatici (cavalli della Giara), cavalli da sella (cavalli da scuola, trekking, concorso), cavalli Purosangue Inglese (galoppatori) e trottatori. I campioni sono stati testati mediante metodo ELISA per la ricerca di Ag, Ab e CIC. Le frequenze delle varie classi di positività sierologica sono state confrontate fra loro attraverso l'utilizzo del test  $\chi^2$  corretto secondo Yates.

Dei 708 sieri testati il 23.4% è risultato positivo all'infezione da BDV (dato che rispecchia i valori medi del 20-40% noti in letteratura per equidi apparentemente sani). La differenza di positività tra maschi (15.9%) e femmine (28.1%) è risultata significativa, e tra le femmine

un fattore di rischio è rappresentato dall'attività riproduttiva indipendentemente dall'età dei soggetti; difatti femmine in età riproduttiva hanno mostrato una positività superiore rispetto a quelle non in attività. Il valore di sieroprevalenza del gruppo dei galoppatori risulta significativamente più elevato (38.2%) rispetto a quanto rilevato nei trottatori (28.9%) e nei cavalli da sella (11.4%). L'appartenenza alla classe dei Purosangue Inglese rappresenta un fattore di rischio legato probabilmente a fattori genetici e di *management*. La prevalenza di infezione del gruppo dei cavalli semi-selvatici risulta inferiore al 3% (Codazza D. & Nativi D. 2005), dati nettamente scostanti da quelli ottenuti da un gruppo di ricerca giapponese (26.9%) che ha operato su una popolazione equina autoctona (cavalli Misaki) (Inoue *et al* 2002). Non è stata evidenziata una differenza significativa in funzione dell'età dei soggetti testati.

Le indagini filogenetiche effettuate hanno evidenziato come i ceppi circolanti in Italia (sottogruppo A, Fig.6) abbiano un'altissima omologia col ceppo di riferimento V e siano pertanto in linea con quanto noto in letteratura (Codazza D. & Nativi D. 2005).



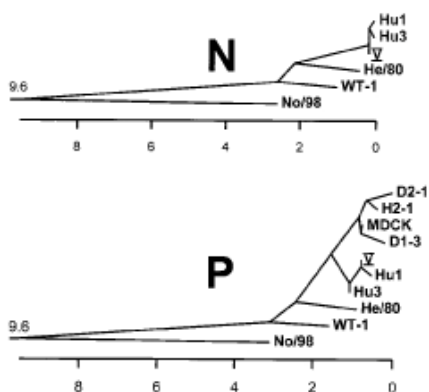
**Fig.6** Albero filogenetico ottenuto mediante metodo Neighbor-Joining, sulla base dei frammenti di 605nt della regione del gene codificante per la proteina p24 isolati dalla popolazione equina e ottenuti dalle sequenze di GenBank/EMBL. Si osservi come i ceppi di BDV isolati da cavalli italiani tendono a formare un cluster (A) particolarmente conservato insieme al ceppo di riferimento BDV V. I gruppi B e C appartengono a ceppi di BDV provenienti da Germania e Svizzera-Liechtenstein (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Questi primi dati dimostrano sia la presenza di BDV nella popolazione equina italiana sia come il nostro Paese possa a tutti gli effetti considerarsi un'area ove l'infezione da BDV assume i caratteri di endemicità (Pisoni G. *et al* 2007).

### 1.3.1.2 EPIDEMIOLOGICA MOLECOLARE

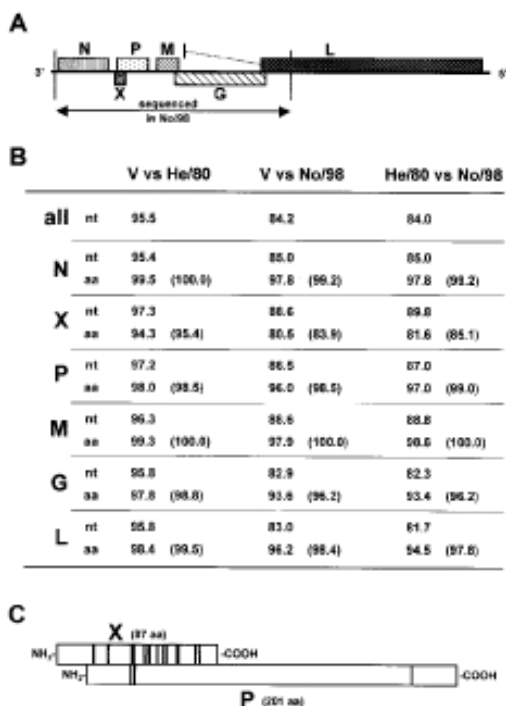
Da alcuni studi (Binz T. *et al* 1994; Staeheli P. *et al* 2000) si mise in evidenza che alcune sequenze di BDV di cavalli, pecore, gatti ed esseri umani isolate in Giappone, Taiwan, Iran, Gran Bretagna e Stati Uniti siano quasi identiche ai ceppi di laboratorio isolati dal centro Europa (ceppo V, He/80, RW98 e H1766); le loro sequenze di acidi nucleici infatti differiscono meno del 5%, supportando l'ipotesi di una non specie-specificità del virus e della sua alta conservazione genetica (Kolodziejek J. *et al* 2005). Questi risultati possono comunque essere interpretati in diversi modi: una variante di BDV dell'Europa centrale isolata e adattata a crescere in conigli venne utilizzata come vaccino vivo attenuato (ceppo 'Dessau') in alcuni parti della Germania. Poiché la sua efficacia risultò discutibile, l'utilizzo di questo vaccino è stato interrotto intorno al 1980 nella Germania occidentale e pochi anni dopo, nella Germania orientale. Così, esiste la possibilità remota che il vaccino con tale ceppo (o per fuga del virus da esso) abbia dato origine al ceppo isolato nei paesi sopra citati. In alternativa, rimane la possibilità che le relazioni sul rilevamento di BDV negli animali e nelle persone provenienti da paesi non europei rappresentino manufatti derivanti da contaminazioni accidentali dei campioni con ceppi di virus di laboratorio; infatti i due ceppi V e He80 vengono utilizzati come ceppo-madre rispettivamente per i laboratori che fanno capo a Berlino e per quelli di Giessen (Durrwald R. & Ludwig H. 1997). E' anche ipotizzabile che esistano in tutto il mondo delle vere miscele di ceppi virali, ma poiché tutti utilizzano le stesse tecniche per individuare il virus, solo alcuni ceppi si rendono visibili. Un'altra possibilità considera tali ceppi provenienti direttamente dall'esportazione di cavalli dall' Europa centrale. Questione ancora irrisolta è il perché la BD sia rimasta per secoli confinata in aree endemiche ben delimitate dell' Europa centrale, nonostante non siano mai state applicate misure restrittive nella movimentazione degli animali, sia tra le aree endemiche e il resto d' Europa, sia tra esse e il resto del mondo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

L'isolamento e la caratterizzazione del nuovo sottotipo No/98, la cui sequenza differisce notevolmente dai virus del gruppo classico europeo (Fig.7), riveste grande importanza dal punto di vista epidemiologico. Esso dimostra che alcune varianti naturali di BDV possano facilmente sfuggire ad un controllo mediante RT-PCR.



**Fig.7** Alberi filogenetici di ceppi di BDV. Sono stati eseguiti confronti della sequenza nucleotidica dei frammenti della regione codificante per il gene N (corrispondenti ai nucleotidi 262-829 V) e dalla regione codificante per il gene P (corrispondenti a 1482-1814 V). Le distanze tra i ceppi indicano la percentuale di divergenza della sequenza. (Nowotny N. et al 2000).

Questo ceppo venne isolato da un pony stallone di sette anni, nato nello stato federale austriaco della Stiria, area indenne per BDV. L'animale non entrò mai nelle regioni endemiche. Il pony presentava un quadro clinico e istopatologico corrispondente alla malattia classica di Borna, la diagnosi preliminare venne poi confermata dall'individuazione immuno-istochimica dell'antigene BDV in sezioni di cervello in paraffina. Inaspettatamente però, l'RNA non venne rilevato nel materiale cerebrale mediante RT-PCR in uso nei protocolli standart utilizzati fino a quel momento; No/98 si differenzia da tutti gli altri ceppi di circa il 15% a livello nucleotidico (Nowotny N. et al 2000). È interessante notare che la conservazione a livello di amminoacidi è molto elevata (93-98%) fatta eccezione per la proteina p10 (proteina X), che è solo l'81% identica alle controparti in altri ceppi di BDV (Fig.8).



**Fig.8** Confronto tra le sequenze di nucleotidi e amminoacidi di BDV No/98 e ceppi di laboratorio comune.

**A** Sono stati sovrapposti il sequenziamento di nucleotidi 25-4.234, prodotti con RT-PCR di No/98 a posizioni del ceppo V di riferimento. Questo frammento comprende le sequenze complete che codificano per le proteine virali N, X, P, M e G e la parte del gene L.

**B** Confronto di nucleotidi (nt) e di amminoacidi (aa) No/98 e sequenze di ceppi di laboratorio V e He/80. Sono indicate le percentuali di identità di sequenza complessiva (tutti) o delle identità dei prodotti di sequenza di particolari geni a livello di nucleotidi e amminoacidi.

**C** Viene indicata con sovrapposizione della regione la conservazione fortemente orientata della sequenza della proteina P nel gene XP. Le posizioni di scambi non conservative di amminoacidi delle proteine X e P sono indicate da barre verticali (Nowotny N. et al 2000).

E' possibile, quindi, che le infezioni da BDV siano più frequenti di quanto si creda. Il lavoro con No/98 suggerisce inoltre che ulteriori varianti di BDV con distinte caratteristiche strutturali possano essere presenti al di fuori dell'Europa centrale. Se, come nel caso di No/98, sono conservati i principali antigeni anche di altri ceppi di BDV non ancora identificati, allora i virus possono essere identificati con metodi di immuno-istochimica utilizzando un *cocktail* di anticorpi monoclonali piuttosto che mediante RT-PCR. Le nuove scoperte implicano che i precedenti studi, che fanno affidamento sulla tecnologia RT-PCR tradizionale, potrebbero avere sottovalutato i tassi di prevalenza e correlazione eziologica delle infezioni umane da BDV (Nowotny N. *et al* 2000).

L'isolamento di un BDV con un genoma altamente variante scalfisce inoltre l'opinione generale dell'alta conservazione sequenziale genomica di BDV, ed apre la possibilità all'esistenza di sottotipi non ancora identificati come dimostrato anche da uno studio effettuato su gatti che, al fine di ottenere un miglior strumento clinico diagnostico per BD felino, ha sviluppato un test *real time* (rRT-PCR) su due piani di analisi. Sonde *TaqMan* e *primer* specifici sono stati progettati per i geni P ed L di BDV, per allineare le sequenze di ceppi BDV noti. Il test riconosce i ceppi V, He/80 e No/98. Il sistema ha rilevato, oltre ai ceppi citati, varianti di BDV in cinque gatti naturalmente infetti e una variante in gatti infettati sperimentalmente. Questo saggio rRT-PCR potrebbe risultare un potente strumento per ulteriori studi di *screening* epidemiologico e mostra come una differente metodica diagnostica possa mettere in luce nuovi sottotipi ancora non conosciuti (Wensman J. *et al* 2007).

Kolodziejek e collaboratori, in uno studio avente lo scopo di acquisire conoscenze più dettagliate relativa all'evoluzione genetica e alla variabilità dei virus della malattia di Borna (BDV) provenienti da diverse regioni all'interno di aree BD-endemiche, hanno permesso per la prima volta di stabilire geograficamente sottogruppi con sequenze di *cluster* separati. Sono state effettuate analisi filogenetiche (per i geni p40, p10 e p24) su 33 campioni di BD virus raccolti da diverse specie animali (Cavalli, pecore e asini), provenienti da diversi paesi dell'Europa centrale (Germania, Svizzera e il Principato del Liechtenstein) in diversi anni (1985-1998). Sono stati utilizzati come ceppi di riferimento:

- Borna V isolato nel 1920 dalla sospensione di cervello di cavallo proveniente dalla Bassa Sassonia, (Germania);



- Borna HE/80 isolato nel 1980 da colture cellulari infettate con materiale proveniente da un cavallo con sintomatologia specifica originario di Baden-Wurtemberg (Germania);
- Borna H1766 isolato dalla sospensione di cervello di un cavallo proveniente dall'alta Sassonia,(Germania);
- Borna No/98 isolato dal cervello di un pony proveniente da una zona dell'Austria (Styria) dove Borna Disease non è endemica.
- BDV Dessau isolato da un cavallo naturalmente infetto della Germania est e successivamente adattato a crescere in colture di coniglio per creare il vaccino vivo usato tra il 1949-1992.

Sono stati così identificati cinque diversi *cluster* che potrebbero essersi stabiliti all'interno delle aree endemiche, corrispondentemente alle regioni geografiche da cui il virus ha origine:

- (I) gruppo per Svizzera, Austria, Valle del Reno e Liechtenstein
- (II) o He/80 gruppo per Baden-Wurtemberg e Baviera
- (III) o RW98 gruppo con presenza limitata alla Baviera
- (IV) o 'Dessau' gruppo per il sud Sassonia-Anhalt e confine settentrionale della Sassonia
- (V) un gruppo misto (simili ai ceppi V e H1766), costituito da campioni di diverse zone della Germania, formato prevalentemente da Stati federali della Turingia e Bassa Sassonia.

E' stata poi effettuata una accurata analisi delle sequenze genomiche dei quattro ceppi di riferimento, mediante multiallineamenti, che ha mostrato:

- ✓ un' identità di sequenza del 96%-99% per quanto riguarda p40, dei ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- ✓ un' identità di sequenza del 97%-99% per quanto riguarda p24, dei ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- ✓ un' identità di sequenza compresa tra l'80%-85% per quanto riguarda p40 e p24 per il Borna No/98 rispetto a Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766.

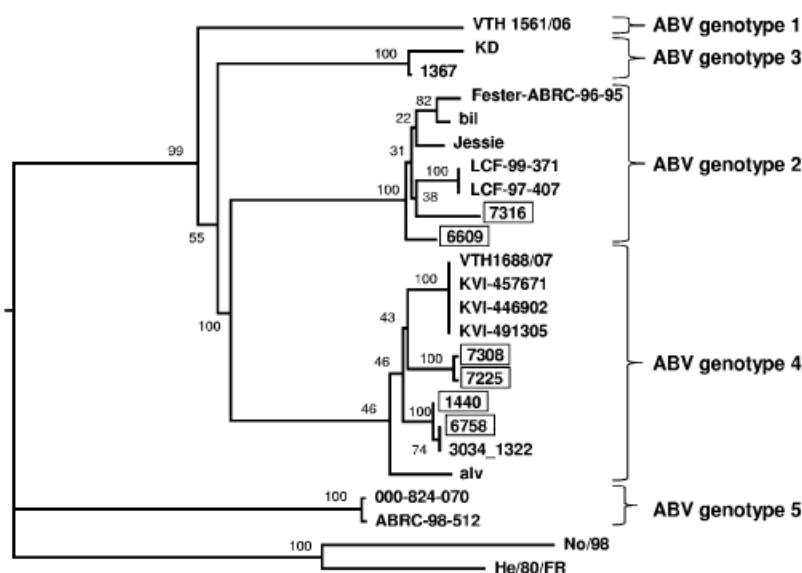
Quindi BDV isolati dalla stessa area geografica dimostrano chiaramente un grado più elevato di identità rispetto ad ogni altro BDV isolato da altre regioni, indipendentemente

dalla specie ospite e dall'anno di isolamento. Inoltre si evince che nonostante la stabilità del genoma insolitamente alta di BDV, all'interno delle diverse aree geografiche, le variazioni di sequenza esistono (Kolodziejek J. *et al* 2005).

Il legame geografico avvalorava ulteriormente l'ipotetico ruolo, sollevato in diversi studi epidemiologici, di alcune specie quali serbatoio dell'infezione (Hilbe M. *et al* 2006).

La distribuzione mista di tre tipi genetici in Baviera e la separazione chiara dei due tipi nella parte orientale della Germania, in una regione esente da barriere geografiche, spinge verso l'ipotesi dell'esistenza di diverse specie di serbatoi o vettori strettamente connessi al territorio. L'ipotesi delle specie serbatoio è ulteriormente supportata dal fatto che gli ospiti finali (cavalli e pecore) mostrano un vincolo di *clustering* non spiegabile da un punto di vista geografico (Kolodziejek J. *et al* 2005). I ceppi Italiani fino ad ora analizzati tendono a formare un *cluster* particolarmente conservato assieme al ceppo di riferimento BDV V, ma con un gruppo (definito come gruppo A) distinto dai gruppi (B e C) provenienti rispettivamente da Germania e Svizzera-Liechtenstein (Codazza D. & Nativi D. 2005).

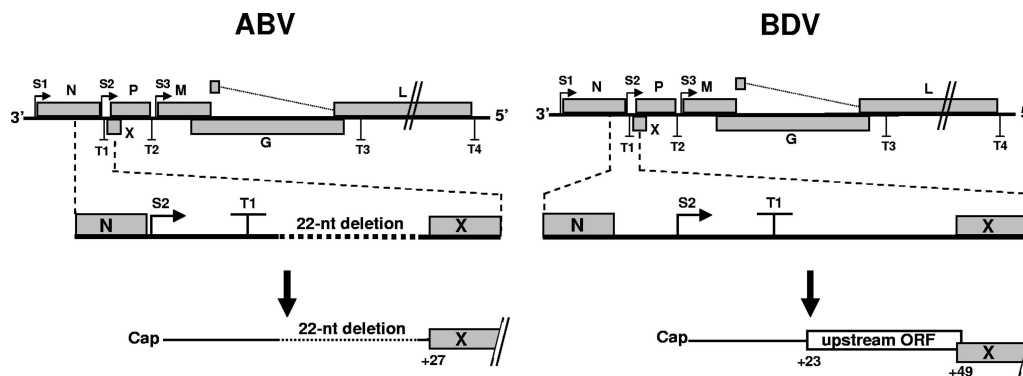
Doverosa è l'apertura di una parentesi per quanto concerne BDV nella specie aviaria. Recentemente è stato creato un nuovo genere all'interno della famiglia *Bornaviridae* indicato come *Bornavirus Aviaria* (ABV) in cui sono stati definiti 6 gruppi genomici differenti (ABV-1;ABV-2;ABV-3;ABV-4;ABV-5;ABV-6) (Weissenbock H. *et al* 2009) (Fig.9)



**Fig.9** Albero filogenetico di ABV basato sulla sequenza del gene N (Rinder M. *et al* 2009).

La differenziazione si è resa necessaria sotto diversi aspetti. Nonostante il genoma di ABV mostri un'identità di sequenza con BDV del 65%, esistono delle differenze notevoli tra i

due virus. In ABV la regione tra il gene N e X è più corta rispetto a BDV; invece analogamente a BDV, il sito S2 di inizio sintesi per mRNA di X/P è posizionato a monte del segnale di terminazione T1, ma in ABV si trova immediatamente a valle del codone di stop della N ORF (*open reading frame*), inoltre il frammento nucleotidico 22 trovato tra il segnale T1 e X ORF manca in BDV (Fig.10) (Rinder M. *et al* 2009).



**Fig.10** ABV e BVD sembrano utilizzare differenti strategie per controllare l'espressione della seconda unità virale. In questo disegno schematico si mostrano i siti di inizio trascrizione (da S1 a S3) e di stop (da T1 a T4) in entrambi i siti genomici virali (nt: nucleotide) (Rinder M. *et al* 2009).

Infezioni sperimentali hanno dimostrato che ABV presenti una spiccata preferenza per le linee di coltura cellulari aviarie; l'isolamento virale è stato infatti possibile in diverse linee cellulari aviarie ma non in quelle di mammifero. Si è inoltre notato che la replicazione di ABV non riguardi esclusivamente le cellule neuronali, come avviene per BDV, ma che interessi un'ampio spettro di linee cellulari con estesa diffusione a organi e tessuti (cuore, fegato, tubo digerente, rene oltre che nel sistema nervoso centrale). Questi risultati possono suggerire ABV come un patogeno virale selettivo per la specie aviarie in cui la trasmissione naturale avvenga tramite contatto fecale per via oro-nasale da uccello a uccello (Rinder M. *et al* 2009), e quindi scalfisce in parte l'ipotesi di questa specie come possibili *reservoirs*.

### 1.3.2 SPETTRO D'OSPITE

Il virus colpisce naturalmente cavalli e pecore, ma anche, meno frequentemente, altri equidi, bovini, capre, conigli, daini, camosci, lama, alpaca, gatti, cani, ratti, topi, gerbilli, procioni, struzzi, animali degli zoo, scimmie rhesus, macachi, uccelli (Hagiwara K. *et al* 2009; Jacobsen B. *et al* 2010; Kinnunen M. *et al* 2007; Nakamura J. *et al* 1998; Staeheli P. *et al* 2000) e sperimentalmente molti altri mammiferi. Molto probabilmente può infettare

tutti gli animali a sangue caldo, incluso l'uomo. *In vitro* BDV può infettare un amplissimo spettro di linee cellulari provenienti da specie animali differenti (Bode L. & Ludwig H. 2003).

Gli studi epidemiologici condotti sino ad oggi hanno interessato prevalentemente le popolazioni equina ed umana, ed in entrambi i casi hanno evidenziato come la sieropositività sia largamente diffusa anche tra i soggetti clinicamente sani. Anticorpi specifici per BDV sono stati cercati e trovati, sia in sieri equini che umani, in nazioni al di fuori dell' Europa centrale (Francia, Polonia, Svezia), oltre che al di fuori dell'Europa stessa (Israele, Giappone, Taiwan, Iran, Stati Uniti). La patologia emerge a livello clinico soprattutto, ma non esclusivamente, nel periodo compreso tra l'inizio della primavera e l'inizio dell' estate, e ne risultano colpiti per lo più i cavalli ospitati in strutture igienicamente non impeccabili, per esempio in fattorie ove alloggiano altre specie di animali, piuttosto che in scuderie specializzate. In alcuni alloggiamenti è stato possibile osservare ripetuti focolai di BD nel corso di più anni, ma è possibile osservare anche numerosi soggetti appartenenti alla stessa struttura che manifestano sintomi di BD nell'arco di pochi mesi. Di fatto gli studi epidemiologici sulla specie equina non sono realizzabili in maniera agevole, a causa della tendenza ai frequenti spostamenti, intrinseca alla specie, in occasione di fiere, concorsi e manifestazioni sportive (Codazza D. & Nativi D. 2005). Indagini sieropidemiologiche (Bahmani M. *et al* 1996; Caplazi P. *et al* 1998; Grabner A. *et al* 1991; Kao M. *et al* 1993; Richt J. *et al* 2007; Yamagichi K. *et al* 1999) condotte su popolazioni equine di molti paesi (Germania, Giappone, Turchia, Iran, Svezia, Cina, Bangladesh, USA, Australia, Italia), con differenti tecniche diagnostiche, hanno permesso di evidenziare valori di prevalenza simili: un valore di siero-prevalenza medio in soggetti apparentemente sani, risulta generalmente compreso tra il 20 e il 40%, ad eccezione di alcune aree della Germania dove sale al 60% (vedi Allegato 1). Non sono mai state registrate predisposizioni di età, mentre in più studi è emersa una maggior siero prevalenza in femmine trottatrici e maschi Purosangue Arabi rispetto ad altri cavalli, inoltre è stata segnalata una maggior prevalenza nelle femmine rispetto ai maschi sia interi che castrati (Codazza D. & Nativi D. 2005). Da questi valori si discosta di molto l'Australia, dove BD non può essere considerato endemico nella popolazione equina, dal momento che la siero-prevalenza si attesta su valori inferiori al 5% (Kamhieh S. *et al* 2005). E' però interessante notare che la siero-prevalenza umana, in Australia, risulta invece dell'ordine del 30% (Bode L. & Ludwig H. 2003).

Una precisazione deve essere fatta per le popolazioni equine “chiuse”, selvatiche o semiselvatiche, che quindi non vengono sottoposte al *management* tipico dei cavalli domestici. Un gruppo di ricerca giapponese ha condotto uno studio di siero-prevalenza su di una popolazione equina autoctona di cavalli selvatici che vivono su pascoli liberi della regione sudorientale di Kyushu, in Giappone. I cavalli entrano in contatto con gli uomini solo una volta l'anno per i trattamenti sanitari stabiliti e per il censimento, con un *management* simile a quello a cui sono sottoposti i cavallini della Giara della Sardegna. I cavalli giapponesi hanno mostrato una siero prevalenza del 20% (Inoue Y. *et al* 2002), in linea quindi con quella generale, mentre per i cavallini della Giara la siero-prevalenza era nettamente inferiore alle medie mondiali, 4.4% (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Come già detto in precedenza BD non è strettamente limitato a cavalli e pecore, anche se la frequenza con la quale la malattia si mostra nelle altre specie sembra essere molto più bassa.

Per la specie ovina, ormai legata storicamente alle manifestazioni cliniche di BD al pari di quella equina, uno studio longitudinale che ha seguito per tre anni un gruppo di 25 pecore in aree endemiche per BDV (regioni del sud-est della Germania), monitorando sia gli anticorpi nel siero, sia la presenza di RNA nel sangue periferico, ha evidenziato una positività del 12.5 (1°anno), 11.5 (2° anno), e 19.4% (3°anno) in relazione alla ricerca anticorpale, e 1.6 (1° anno), 0 (2°anno), e 14.9% (3°anno) per quella relativa all'RNA. Lo studio inoltre ha riconfermato la stagionalità della manifestazione clinica, come già da tempo dimostrata, nei mesi primaverili e in inizio estate. I soggetti persistentemente infetti hanno mostrato l'eliminazione virale attraverso le secrezioni nasali, salivari e congiuntivali, ma non attraverso le urine. L'allontanamento dei soggetti positivi dal gregge non ha comunque ridotto, nell'anno seguente, la prevalenza di infezione per BDV (Vahlenkamp T. *et al* 2002).

BDV è stato trovato in asini, capre e bovini che presentavano sintomi neurologici e forti infiltrazioni linfocitarie nel sistema nervoso centrale. Alcuni dei bovini malati provenivano da aziende in regioni della Germania in cui BD non è endemica in cavalli e pecore. I pochi studi di siero-epidemiologia condotti sui bovini mostrano una prevalenza di infezione estremamente varia nelle diverse regioni, si passa da sieropositività prossime al 50 %, a segnalazioni prossime allo zero (Bode L. & Ludwig H. 2003; Hagiwara K. *et al* 2001).

Antigene e virus di BDV sono stati ritrovati nel sistema nervoso centrale di due conigli con malattia neurologica che provenivano dalla regione endemica della Svizzera, inoltre una precedente relazione descriveva l'isolamento di BDV dal cervello di un coniglio con malattia neurologica (Staehele P. *et al* 2000).

Antigene e RNA di BDV sono stati ancora trovati nell'encefalo di animali da zoo di Turingia e Germania, che mostravano malattie neurologiche. Struzzi che presentavano un quadro di paresi a carico degli arti inferiori in Israele sono stati testati sierologicamente per BDV presentando positività per esso, ma dato che non sono state eseguite analisi istologiche e immuno-istochimiche, questi risultati sono piuttosto preliminari e devono essere considerati con cautela, anche prendendo in considerazione un'eventuale infezione da ABV in tale specie (Staehele P. *et al* 2000).

Altri lavori hanno dimostrato l'antigene e l'RNA di BDV nel sistema nervoso centrale di un cane con grave infiammazione encefalica e sintomatologia neurologica che aveva vissuto in una zona endemica in Austria e hanno dimostrato l'infezione naturale nei canidi. RNA virale è stato anche diagnosticato mediante PCR in alcune volpi (Dauphin G. *et al* 2001; Weissenböck H. 1998a).

Staehele *et al* (2000) hanno riportato un caso di meningoencefalite non suppurativa simile a quella da BD equina in una lince. Prove di immuno-istochimica risultarono positive per l'antigene di BDV. Il sequenziamento di un frammento BDV p24 amplificato mediante RT-PCR dall'encefalo di questo animale differiva di oltre il 2% dai ceppi noti per BDV.

Uno studio recente descrive BDV in due alpaca maschi, originari della Baviera, che presentavano soppressione sessuale cronica ed episodi convulsivi ripetuti; la conferma diagnostica è stata effettuata tramite immuno-istochimica, ibridazione in situ e PCR; l'analisi della sequenza genetica ha inoltre rivelato un'omologia del 99% per il ceppo della Baviera (Jacobsen B. *et al* 2010).

In Giappone (Hokkaido), durante una campagna di controllo, sono stati catturati e sottoposti ad eutanasia 549 procioni. Testati per la ricerca sierologica di BDV attraverso ELISA, confermata poi con RT-PCR, hanno mostrato una positività del 2%, di cui il 72.7% era formato da soggetti maschi. Dalla comparazione della sequenze genetiche con quelle

di altre specie animali si è nuovamente confermata l'elevata omologia (dall'81.5-97.7%) (Hagiwara K. *et al* 2009).

Per quanto riguarda BDV nei felini la sua presenza è stata segnalata in numerose nazioni: Germania, Svezia, Regno Unito, Giappone, Turchia, Italia, con siero-prevalenze molto diverse (Berg A. *et al* 1998; Helps C. *et al* 2001; Lundgren A. *et al* 1995; Nakamura Y. *et al* 1996; Nakamura Y. *et al* 1999; Patti M. *et al* 2008); l'età dei soggetti testati non risulta essere un fattore che influisce sulla sieroprevalenza, al contrario del sesso: è stato infatti chiaramente dimostrato come siano maggiormente colpiti i gatti maschi, ma questo probabilmente dipende dal comportamento aggressivo che potrebbe renderli più esposti all'infezione. Secondo alcuni autori i gatti selvatici o domestici che potevano avere contatti con l'esterno sono risultati meno colpiti rispetto a quelli strettamente domestici (Helps C. *et al* 2001), in contrasto però con un altro studio nel quale gatti con accesso esterno hanno mostrato prevalenze di infezioni più alte (Berg A. *et al* 1998). La differenza fra i due studi, oltre alle tecniche diagnostiche usate, sta nell'ambiente di provenienza dei gatti testati: nel primo caso una grande città, nel secondo un ambiente rurale. La prevalenza dei gruppi di gatti che presentavano altre patologie concomitanti risultano essere due-tre volte superiori rispetto gruppi di gatti sani. In particolare sembra esserci una correlazione positiva tra la sieropositività per FIV e BDV, ma lo stesso non si è visto per quanto concerne FeLV (Codazza D. & Nativi D. 2005; Nakamura J. *et al* 1999). Questo risultato ha comunque spinto molti autori a postulare un'azione di BDV come patogeno opportunista, dato sostenuto anche dalla relazione positiva tra BDV umano e pazienti HIV positivi (Bode L. *et al* 1998; Cotto E. *et al* 2003). Sempre in considerazione a questo aspetto un altro lavoro ha dimostrato che esiste una maggior siero prevalenza umana (13-14%) in pazienti con malattie croniche progressive del sistema nervoso centrale e del sistema immunitario, rispetto a soggetti sani (2%) (Bode L. *et al* 1992).

La questione se BDV induca o sia correlato alla *staggering disease* (malattia barcollante) dei gatti risulta ancora poco chiara. Dalle prime relazioni è emerso che un'elevata percentuale (44%) di gatti svedesi affetti da questa patologia presentava anticorpi nel siero per BDV, però all'esame immuno-istochimico dell'encefalo solo tre dei 24 gatti malati presentava espressione dei marcatori virali. Al contrario, gatti con *staggering disease* in Austria sono stati segnalati privi di livelli rilevabili di marcatori BDV nel SNC. Una relazione del Giappone ha mostrato che bassi livelli di antigeni specifici per BDV e RNA erano

presenti nel cervello di un gatto con infiammazione del SNC e sintomi neurologici non correlabili a tale sindrome. In un altro studio svizzero, solo uno dei 180 encefali di gatti con sindrome da *staggering disease* ha confermato l'infezione da BDV con l'immuno-istochimica, gli altri 179 sono risultati negativi per immuno-istochimica e RT-PCR. Un altro studio ha invece confermato positività per BDV in un gatto che presentava paralisi senza però presentare caratteri di infiammazione del SNC. L'acido nucleico virale, che è stato amplificato mediante RT-PCR dal tessuto cerebrale, ha mostrato il classico genotipo europeo, strettamente collegato per il ceppo He/80. Infine, RNA specifico per BDV è stato trovato con RT-PCR nell'encefalo di alcuni gatti malati nel Regno Unito, ma l'infezione da BDV di questi animali non è stato confermato con altri metodi. Un'interpretazione conservatrice di questi risultati può concludere che, nonostante varie infezioni naturali di BDV nei gatti si possano occasionalmente verificare, questo virus non sia probabilmente l'agente eziologico della malattia da *staggering disease* (Staehele P. *et al* 2000).

I virus patogeni per la specie aviarie si classificano a parte come ABV. Anche in questi animali sono stati fatti diversi studi di ricerca virale, in particolare si è cercato di stabilire se esista o meno una correlazione con la malattia di dilatazione proventricolare (PDD). Tre diversi studi confermano l'esistenza di una elevata positività per ABV negli uccelli colpiti da PDD (positività che va dal 90 al 100%) e l'assenza di ABV in soggetti clinicamente sani (Kistler A. *et al* 2008; Villanueva I. *et al* 2009; Weissenbock H. *et al* 2009). In controtendenza invece i risultati ottenuti da Rinder *et al* (2009): su 13 volatili affetti da PDD solo 6 sono stati confermati per ABV. Tuttavia secondo gli stessi autori esiste la possibilità che la diagnostica non sia stata effettuata correttamente e che possano comunque esistere altri genotipi per ABV non ancora conosciuti e quindi non rilevabili con le metodiche attuali. Dall'analisi filogenetica, eseguita in tutti gli studi, emerge una maggior prevalenza di ABV-2 e ABV-4, mostrando inoltre un'omologia di sequenza per campioni raccolti in Europa, Stati Uniti, Israele ed Australia. Come già osservato per BDV, ABV non risulta avere caratteristiche di specie-specificità né sono riconoscibili ad oggi *marker* geografici (Weissenbock H. *et al* 2009).

### 1.3.3 VIA DI TRASMISSIONE

A lungo è stato ritenuto valido l'assunto che la trasmissione fosse principalmente di tipo orizzontale: il virus verrebbe eliminato da un organismo infetto attraverso secreti ed escreti, quali saliva, secrezioni nasali e congiuntivali, e la trasmissione avverrebbe per



contatto diretto, oppure attraverso l'assunzione di acqua o cibo contaminato da urine di possibili animali serbatoio (Codazza D. & Nativi D. 2005). L'RNA virale è stato rilevato in secrezioni nasali e lacrimali e nella saliva di una piccola frazione di animali sintomatici e nei medesimi secreti di cavalli sani ma sieropositivi (Richt J. & Rott R. 2001). La via intranasale è la più accreditata tra le possibili vie di trasmissione orizzontale, poiché risulta particolarmente facile e veloce l'accesso virale al sistema nervoso centrale, seguendo gli assoni del nervo olfattorio (Morales J. et al 1988; Sauder C. & Staeheli P. 2003). Studi di infezione sperimentale nei ratti dimostrano come l'inoculazione per via intranasale porti lo sviluppo della malattia in circa 20 giorni, se l'inoculazione viene praticata nei cuscinetti plantari posteriori in 50-60 giorni, mentre se si usa una via endovenosa o attraverso gli arti posteriori di soggetti nevretozzati l'infezione non si manifesta (Carbone K. et al 1987). Tuttavia è necessario precisare che la trasmissione orizzontale non è mai stata sperimentalmente provata (Codazza D. & Nativi D. 2005).

In un caso di infezione naturale è però stata documentata la trasmissione verticale da una giumenta al suo redo. La giumenta in questione è stata sottoposta ad eutanasia dopo la comparsa di sintomatologia nervosa riconducibile a malattia di Borna. Sono stati ricercati anticorpi anti-BDV nel siero e nel liquido cerebrospinale della madre e nel feto mediante Western blot e sono state fatte ricerche di RNA-BDV con RT-PCR su encefalo e su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). In entrambi, ed è stata eseguita un'analisi istologica ed immunoistochimica sul tessuto cerebrale. Il siero e il liquor della madre sono risultati positivi, mentre il feto era negativo, la RT-PCR su encefalo e per PBMC è invece risultata positiva per entrambi, inoltre l'istologia cerebrale materna presentava le lesioni infiammatorie caratteristiche per BDV (Hagiwara K. et al 2000; Watanabe Y. et al 2007). È stato anche dimostrato come possano essere trasmessi anticorpi attraverso il colostro, almeno nella specie ovina (Vahlenkamp T. et al 2002), per cui bisognerebbe escludere dalle indagini sierologiche soggetti con età inferiore ai tre mesi. Nel medesimo studio si vide però che seguendo 15 agnelli, nati da madri infette, dopo oltre i tre mesi di età, solo un soggetto presentava anticorpi anti-BDV. Questa osservazione lascia supporre che la via di trasmissione verticale, almeno nella specie ovina, sia poco frequente. Alcuni autori però sono del parere che i sieri di animali nati da madri infette da BDV potrebbero essere sieronegativi nei primi mesi, nel caso in cui il patogeno venga trasmesso al feto nel tardo periodo di gestazione se non addirittura al momento del parto. Alcuni quindi sostengono che la via di trasmissione più comune sia quella verticale e che si verificherebbe negli

ultimi tre mesi di gravidanza. Di fatto le vie di trasmissione del virus non sono state del tutto chiarite. Inoltre la presenza del virus nel sangue periferico, legato ai polimorfonucleati, ad anticorpi a formare immunocomplessi o libero, non è compatibile con una infezione strettamente neurotrofa ma lascia supporre che l'infezione da BDV possa presentarsi in differenti forme, tra le quali appunto la forma associata a cellule ematopoietiche (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Osservazioni epidemiologiche più approfondite in campo veterinario sono state condotte sulla specie equina. La patologia emerge a livello clinico soprattutto, ma non esclusivamente, nel periodo compreso tra l'inizio della primavera e l'inizio dell'estate, e ne risultano colpiti soprattutto i cavalli ospitati in strutture igienicamente non impeccabili, per esempio in fattorie ove alloggiano altre specie di animali, piuttosto che in scuderie specializzate. La periodicità e la mancanza d'igiene, unitamente all'assenza di mutazioni specie-specifiche nel genoma, fanno supporre l'esistenza di un unico serbatoio (Codazza D. & Nativi D. 2005). I dati epidemiologici attualmente in possesso fanno pensare ad una o più specie di insettivori, in particolare un toporagno bicolore (*Crocidura leucodon*) che vive nelle aree agricole e si nutre di lumache, insetti e foraggi. Un recente studio condotto tramite la cattura di 8 talpe, 3 toporagni e 87 topi di diversa specie (catturate tra il 1999 e 2003 in un villaggio Svizzero endemico per BDV) ha rilevato la presenza di BDV nell'encefalo di tutti i toporagni sottoposti a controllo (n:3) ma in nessuno degli altri soggetti esaminati (attraverso IHC verso p24 e p38/40). Dall'esame della sequenza genetica è emersa una similitudine del 99.9% simile a quella di BDV proveniente da due cavalli morti per BDV nell'analoga regione. Si è quindi potuto ipotizzare che tali toporagni possano fungere da serbatoi, i quali trasmetterebbero il virus attraverso urina e/o saliva che contaminerebbe i foraggi. Il foraggio così contaminato utilizzato per alimentare cavalli e ovini favorirebbe l'infezione virale che potrebbe avvenire attraverso il nervo olfattorio od il trigemino. Essendo questa ipotesi ad oggi non ancora avvalorata scientificamente, non è da escludere però un differente ciclo epidemiologico anche legato all'esistenza di differenti serbatoi (Hilbe M. *et al.*, 2006). Anche gli artropodi vengono citati come potenziali vettori virali, anche se BDV non è mai stato isolato da insetti, almeno in Europa. Le zecche, e si pensa soprattutto alla specie *Hyalomma truncatum*, sono vettori nei paesi dell' Est Europeo di encefalomieliti equine sovrapponibili alla BD. Altri autori suggeriscono la possibilità che siano coinvolti nella trasmissione della malattia degli uccelli selvatici migratori. Recentemente è stata dimostrata la presenza di materiale genetico di BDV nelle

feci di uccelli migratori (anatre e cornacchie sane), dimostrando che tali uccelli possano essere portatori asintomatici del virus. Il coinvolgimento di uccelli migratori viene postulato, sebbene non provato, anche da autori israeliani, che hanno notato come la distribuzione di sieropositività nella specie equina sul territorio nazionale sia sensibilmente più elevata nelle aree in corrispondenza delle rotte di migrazione, parallelamente a quanto avviene per le encefalomieliti virali (Codazza D. & Nativi D. 2005). C'è però da ricordare che la recente formazione del genere ABV e l'individuazione di elevate differenze con BDV hanno portato a pronunciarsi sulla non possibilità di ABV nell'essere ritenuto agente virale per i mammiferi e quindi cadrebbe il concetto di serbatoio degli uccelli per le altre specie (Rinder M. *et al* 2009; Weissenbock K. *et al* 2009).

Di opinione diversa restano altri autori, più cauti nel pronunciarsi sui *reservoirs*, secondo i quali lo spettro d'ospite ampio e il fatto che la maggior parte delle infezioni di BDV rimane subclinica sembrano suggerire che vi sia una circolazione virale intra-specifica piuttosto che esistano serbatoi specifici o vettori che agiscano come fonte di infezione. In quest'ottica sarebbero gli stessi cavalli a fungere da serbatoio per il virus, poiché essi rimangono sieropositivi per anni pur non manifestando una chiara sintomatologia a livello clinico. Il virus della malattia di Borna, può causare l'infezione persistente del sistema nervoso centrale. La riattivazione virale può essere innescata da diversi stimoli: cambiamenti del sistema immunitario (immunosoppressione), fattori di stress, superinfezione da virus o altri traumi. Questi cavalli sarebbero quindi soggetti a manifestare delle sottili alterazioni comportamentali quando fattori stressanti vari o malattie concomitanti abbassano transitoriamente le loro difese immunitarie (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Antigeni virali (Ag), anticorpi (Ab), immunocomplessi circolanti (CIC) e RNA, possono essere isolati dal tessuto cerebrale, dal liquido cerebrospinale e dal siero. Dopo l'attivazione di infezione latente è possibile rilevare gli Ag. Nella seconda fase della viremia acuta, gli Ag si legano con Ab e formano i CIC. Originariamente per la diagnosi di infezione da BDV sono stati rilevati solo gli Ab virali, ma il riscontro positivo per essi significa che l'organismo è stato in contatto con BDV ma non implica necessariamente un'infezione attiva. Grazie allo sviluppo di tecniche diagnostiche quali ELISA verso CIC, Ag e Ab è possibile valutare lo stadio dell'infezione in cui si trova il soggetto (Bode L. *et al* 2001).

Da quanto esposto fino ad ora appare chiaro come siano ancora molti i punti non chiari nell'epidemiologia di BD; ad esempio non è chiaro perché BD sia rimasto per secoli confinato in aree endemiche ben delimitate del centro Europa, nonostante non siano mai state applicate misure restrittive nella movimentazione degli animali, né è stato ancora chiarito il ruolo di possibili serbatoi. L'unica cosa che appare certa è che la diffusione di BDV sia più ampia di quanto si potesse pensare in passato, sebbene ancora una volta non sia chiaro se ciò sia da imputare ad una reale maggior diffusione del virus o piuttosto, più probabilmente, ad un aumento di interesse verso tale malattia e al conseguente impiego di tecniche diagnostiche più avanzate e precise (Codazza D. & Nativi D. 2005).

## **1.4 PATOGENESI**

### 1.4.1 NEUROINVASIONE E PROPAGAZIONE

La via di penetrazione più probabile del virus nell'organismo sembra essere il neuro epitelio olfattorio. E' stata dimostrata in laboratorio in diverse specie, sebbene sperimentalmente sia possibile riprodurre l'infezione anche per via intracerebrale, intraperitoneale, intraneurale, sottocutanea e perfino per via intestinale (Carbone K. *et al* 1987; Katz J. *et al* 1998; Sauder C. *et al* 2003).

Una volta penetrato nell'organismo, il virus procederebbe per via intra-assonale a partire dalle terminazioni del nervo olfattorio, o del trigemino, fino a raggiungere il sistema nervoso centrale, dove si replica nei neuroni e nelle cellule della glia (preferenzialmente nel sistema limbico) per poi estendersi al sistema nervoso periferico e alle cellule della retina (Richt J. & e Rott R. 2001). Il meccanismo con cui BDV passi da un neurone all'altro nello spazio sinaptico non è tutt'ora stato chiarito; alcuni ritengono che questo avvenga per captazione delle nuove particelle virali rilasciate nello spazio sinaptico, dopo un ciclo di replicazione completo (Codazza D. & Nativi D. 2005), altri autori però, sostengono l'ipotesi secondo la quale solo il materiale genetico del virus, probabilmente sotto forma di RNA o ribonucleoproteine (RNP), attraversi le sinapsi per propagarsi poi nel SNC ancora in forma incompleta, spiegando così la sua impercettibilità morfologica in tali tessuti (Bajramovic J. *et al* 2003; Castrucci G. 2002; Gosztanyi G. *et al* 2005).

La diffusione avviene per via retrograda, sempre via assoni, e il virus si localizza nelle terminazioni periferiche dei nervi in seno a diversi organi: milza, parotide, polmone, cuore, reni, vescica, ovaie, nonché, essendo stato ritrovato nelle secrezioni salivari, congiuntivali e lacrimali, anche nelle ghiandole esocrine. La patologia è causata dalla reazione del sistema immunitario nei confronti del patogeno con lo sviluppo della conseguente encefalomielite linfocitaria disseminata, che provoca la distruzione dei neuroni e l'idrocefalia conseguente; difatti la comparsa dei sintomi clinici avviene in coincidenza con lo sviluppo della reazione infiammatoria. A prova di ciò, animali immunodepressi o immunosoppressi sperimentalmente non manifestano la malattia e le lesioni caratteristiche a dispetto dell'attività replicativa del virus nel tessuto nervoso (Castrucci G. 2002; Richt J. & Rott R. 2001). In corso di infezioni sperimentali si è inoltre potuto chiarire come la reazione infiammatoria avvenga soprattutto per intervento della risposta immunitaria cellulo mediata, piuttosto che di quella umorale. Sia i linfociti T CD4+ che i CD8+ sono presenti negli infiltrati del SNC e contribuiscono allo sviluppo della reazione infiammatoria (Bilzer T. *et al* 1995). Indagini condotte *post mortem* su tessuti cerebrali di pecore infette hanno mostrato come linfociti CD4+ e CD8+ siano presenti sia negli infiltrati perivascolari che parenchimali che meningei (Vahlenkamp T. *et al* 2002). In genere i CD4+ sono in numero maggiore rispetto i CD8+ negli infiltrati perivascolari, mentre accade il contrario negli infiltrati parenchimali; linfociti B e macrofagi sono invece presenti in minor misura (Sobbe M. *et al* 1997). Le cellule T CD8+ sono le responsabili della distruzione delle cellule cerebrali infette dal virus, mentre i T CD4+ hanno un ruolo di supporto per le TCD8+ e per la produzione di anticorpi antivirali (Furrer E. *et al* 2001). La eliminazione delle cellule CD8+ o il loro blocco di funzione, ha come risultato la prevenzione dell'insorgenza delle manifestazioni neurologiche e delle alterazioni istopatologiche (Castrucci G. 2002). La competenza del sistema immunitario influenza la possibilità della malattia di emergere sul piano clinico, ma non la capacità del virus di diffondersi nei vari tessuti dell'organismo, che pare invece essere correlata all'età del soggetto al momento dell'infezione. Nei soggetti neonati, il virus non si limita al tessuto nervoso ma si diffonde in breve tempo a tutto l'organismo; ratti neonati infettati sperimentalmente, pur non presentando la reazione infiammatoria e la sintomatologia nervosa dei soggetti adulti, sviluppano un'infezione che persiste per tutta la vita del soggetto caratterizzata da una mancata risposta immunitaria cellulo-mediata, ma evidenziano delle alterazioni del SNC quali: riduzione della corteccia, ipoplasia cerebellare, degenerazioni dei neuroni del giro dentato e delle cellule del *Purkinje* del cervelletto; queste sono probabilmente le

conseguenze della capacità di BDV di indurre danni al flusso assoplasmatico e sinaptico, con conseguente diminuzione del traffico interneurale di fattori di crescita necessari per un corretto mantenimento e funzionamento neuronale. Questa condizione viene definita come “*persistent, tollerant infection of the newborn*” (PTI-NB) *rats*. Tali soggetti crescono meno del normale e mostrano deficit cognitivi ed emozionali (Gonzalez D. *et al* 2000; Pletnikov M. *et al* 1999). Quindi l’infezione da BDV interferisce con il processo evolutivo di determinate aree del SNC particolarmente coinvolte nel meccanismo di maturazione post-natale; in particolare contrasta la principale funzione delle cellule del *Purkinje* che è quella di favorire la moltiplicazione, la maturazione e la migrazione delle cellule granulari. D’altra parte, gli astrociti designano le modalità di migrazione delle suddette cellule oltre ad esplicare un’azione immunoprotettiva a favore delle cellule del *Purkinje*. Pertanto, l’intesa astrocitosi riscontrabile nei ratti PTI-NB potrebbe essere coinvolta nel fenomeno che provoca il blocco della migrazione delle cellule granulari. Nell’ippocampo dei ratti PTI-NB è sempre presente la concentrazione più elevata del virus, tuttavia questo non interferisce con la normale vitalità dei neuroni, con la sola eccezione della circonvoluzione dentata dell’ippocampo i cui neuroni subiscono un progressivo processo degenerativo. La maggioranza delle cellule granulari presenti nella circonvoluzione dentata dell’ippocampo viene prodotta dopo la nascita e la neurogenesi in questa particolare area evolve in età adulta (Castrucci G. 2002; Mayer D. *et al* 2005; Pletnikov M. 1999). Queste osservazioni ci possono spiegare casi come quello rinvenuto in un gatto, infettato naturalmente, che presentava una forma clinica anomala con fascicolazioni muscolari e assenza delle caratteristiche lesioni del SNC sebbene il genoma virale per BDV fosse stato rilevato nei neuroni; secondo gli autori sarebbe un caso di infezione intrauterina o perinatale (Codazza D. & Nativi D. 2005). Alcuni studi dimostrano che un sistema umorale efficiente sembra comunque non essere in grado di neutralizzare la progressione del virus e la sua ripercussione clinica, poiché sono stati rilevati nel *liquor* anticorpi specifici in presenza di BDV sintomatica, ma altri autori hanno dimostrato come il trasferimento di immunità passiva mediante inoculo di anticorpi anti BDV in *Lewis rats* immunocompromessi (dove la diffusione del virus riguarda oltre che il SNC anche tessuti extra-nervosi) abbia impedito la diffusione del virus in tessuti al di fuori del SNC; ricordiamo che soggetti della stessa specie immunocompetenti presentano invece diffusione solo nel SNC; da ciò si evince che lo sviluppo di immunità umorale possa rivestire un ruolo di rilievo nella diffusione del virus nell’organismo (Stitz L. *et al* 1998). In corso di infezione naturale gli anticorpi sono generalmente a basso titolo e non sono presenti per tutta la durata della vita dell’animale

(Durrwald R. & Ludwig H. 1997); sono riscontrabili periodi in cui gli anticorpi non risultano rilevabili e altri in cui il loro livello sale, questo in relazione con l'espressione del genoma virale, a sua volta subordinato a fattori sia genetici che fisiologici che ambientali (stress, altre patologie, concorsi sportivi etc). Nei soggetti acuti di BD, la ricerca anticorpale porta a risultati positivi nella totalità dei soggetti colpiti, mentre nei casi iperacuti non sempre si riescono ad isolare gli anticorpi verso BDV (Codazza D. & Nativi D. 2005); uno studio sperimentale condotto su tre pony, infettati per via intracerebrale, ha permesso di evidenziare come la sierconversione fosse osservabile, tra l'altro in forma modesta, solo nel soggetto che superava la malattia (gli altri due pony morivano a 28 e 30 giorni post inoculo) e comunque solo dopo comparsa dei segni clinici (Katz J. *et al* 1998). Ricordiamo che BDV è stato evidenziato anche nei polimorfonucleati circolanti, anche in soggetti sieronegativi (Vahelenkamp T. *et al* 2000); questo oltre a mettere in dubbio l'ipotesi che BDV sia un virus strettamente neurotrofo, in parte potrebbe giustificare dal punto di vista patogenetico il decorso clinico di alcune forme di infezione caratterizzate da periodi di infezione latente alternati a periodi di attivazione virale, riscontrate sia nei cavalli che nell'uomo. Pazienti psichiatrici alternano ripetutamente periodi di instabilità mentale a periodi di normalità. Studi longitudinali condotti sui cavalli hanno evidenziato una correlazione tra il manifestarsi della sintomatologia e l'espressione degli antigeni (N-p40 e P-p24) e la trascrizione dell'RNA virale nei polimorfonucleati del sangue. Questo, oltre a far supporre una correlazione del meccanismo patogenetico nella specie equina ed umana, evidenzerebbe la possibilità che la sintomatologia, in questi casi, più che da correlarsi alla reazione infiammatoria, sia legata ad un disturbo transitorio della neurotrasmissione, soprattutto a livello limbico. I periodi di attivazione potrebbero essere legati alla produzione di ribonucleoproteine (RNPs) virali, o solo proteine, che sarebbero responsabili di tale alterazioni; l'infezione coinvolgerebbe specifici percorsi neurotrasmettitori e la sua diffusione nell'ippocampo coinciderebbe con l'infezione di alcuni recettori aminoacidici, quali ad esempio il glutammato (Bode L. & Ludwig H. 2003; Castrucci G. 2002; Codazza D. & Nativi D. 2005). Alcuni autori riportano come l'infezione persistente del SNC da parte di BDV determini l'interessamento predominante degli astrociti con conseguente sviluppo di astrocitosi; considerando che essi rivestono un ruolo essenziale nel mantenimento di un microambiente necessario per una corretta funzionalità neuronale, se colpiti da infezione si influenza negativamente la loro capacità di catturare il glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNC, e quindi qualunque disturbo di questo delicato sistema-glutammato sarebbe in grado di influenzare

negativamente l'intero sistema limbico dei neurotrasmettitori, (sistema che comprende anche serotonina, dopamina e noradrenalina). Tale meccanismo di interferenza non è ancora chiaro anche se è stata postulata l'esistenza di un fattore solubile sintetizzato e secreto dalle cellule infette (Codazza D. & Nativi D. 2005; Gosztonyi G. & Ludwig H. 1995). Livelli eccessivi di glutammato extracellulare, inoltre, possono causare tossicità e morte neuronale. BDV sembra avere un'affinità particolare per le regioni encefaliche ricche di recettori per l'aspartato e il glutammato, e questo non fa che supportare l'ipotesi del coinvolgimento del sistema glutammato nell'insorgenza di disturbi neurologici reversibili, ascrivibili in misura maggiore alla sfera comportamentale. Anche il sistema dopaminergico sembra essere coinvolto, soprattutto nelle fasi iniziali della patologia, e, nei ratti neonati si è visto interessare anche i sistemi serotoninergici e noradrenergici (Codazza D. & Nativi D. 2005). Come già accennato gli astrociti sono essenziali per i neuroni in quanto presiedono al meccanismo che ne regola la migrazione nel corso dello sviluppo cerebrale e unitamente ad essi partecipano alla organizzazione delle diverse funzioni cerebrali; gli astrociti, inoltre, sono coinvolti nel meccanismo che regola l'eliminazione delle neurotossine e la produzione delle citochine che possono agire come fattori di differenziazione e come modulatori delle espressioni genetiche dei neuroni. Nel cervelletto e nell'ippocampo dei ratti PTI-NB viene osservato un supercontrollo delle citochine IL-1 alfa e beta, IL-6 e del fattore alfa della necrosi, responsabili del processo infiammatorio; nel cervello degli stessi ratti non si osservano gli infiltrati di cellule immunitarie caratteristici ma solo una marcata astrocitosi. Altro reperto osservato nell'encefalo di ratti PTI-NB è costituito da un'aumentata produzione del fattore tissutale (TF) o recettore di trasmembrana, che nel SNC è prodotto dagli astrociti e che si identifica con il principale catalizzatore del processo enzimatico a cascata della coagulazione che sfocia nella formazione della trombina. La presenza di BDV è associata all'aumento dell'attività codificante del gene TF. Appare sempre più credibile l'ipotesi secondo cui le proteine della coagulazione e i sistemi connessi alla fibrinolisi possano avere, nel SNC, funzioni che prescindono dalla coagulazione del sangue, come quella di regolare il normale sviluppo del cervello e di preservarlo dai danni provocati da eventuali traumi. Le alterate attività delle proteasi possono contribuire alla comparsa di alterazioni di diverse patologie neurodegenerative, fra cui la malattia da *Alzheimer*. E' interessante osservare che la trombina è per lo più espressa dai neuroni dopaminergici del mesencefalo e ciò suggerisce la possibilità di una correlazione fra il controllo del fattore tissutale e le anomalie dopaminergiche osservate nella malattia di Borna nel ratto (Castrucci G. 2002).



## **1.5 SINTOMATOLOGIA**

### 1.5.1 INFEZIONE NATURALE

Il peculiare comportamento del virus, e le osservazioni in merito alla sieroprevalenza, hanno permesso di giungere alla conclusione che la maggior parte dei soggetti sieropositivi non manifesta la malattia in alcun modo sul piano clinico. Solo quella che viene definita come “la punta dell'iceberg”, manifesta una sintomatologia variabile (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Uno studio che ha coinvolto più di 100 cavalli sani ma sieropositivi ha evidenziato che circa il 20% degli animali ha iniziato a manifestare sintomi neurologici entro un anno, portando un terzo di essi ad essere abbattuto. Sono stati inoltre esaminati gli encefali di sei animali sani (tre pecore, un cavallo, un asino e un mulo) provenienti da una stalla, dove un'epidemia locale di BD aveva portato a morte altri animali: anticorpi sierici per antigeni di BDV e una lieve encefalite è stata rinvenuta in tutti e sei i soggetti. Questi e altri studi stabiliscono la chiara esistenza di portatori asintomatici, almeno temporaneamente, nelle aziende agricole con casi sintomatologici sporadici di BD (Staehele P. *et al* 2000).

La malattia può decorrere in tre forme: lievi alterazioni comportamentali alternate a dei periodi di normalità, grave malattia neurologica che generalmente si risolve con la morte dell'animale, oppure, nella maggior parte dei casi, infezione asintomatica. Tale suddivisione è nota nella specie più studiata, cioè quella equina, ma si può ritenere valida per l'intero spettro di ospiti. I portatori asintomatici sono anche eliminatori del virus attraverso escreti e secreti e potrebbero giocare un ruolo chiave nel mantenimento e nella diffusione dell' infezione. A tutt'oggi non è chiaro se la manifestazione clinica dell'infezione dipenda da fattori propri del virus (sierotipo, virulenza) piuttosto che da fattori propri del soggetto colpito, in particolare uno status immunitario deficitario e la genetica (cavalli Lipizzani). L'ipotesi secondo cui alcuni soggetti sarebbero geneticamente predisposti alla resistenza nei confronti del virus e altri no potrebbe giustificare anche la distribuzione geografica della BD clinica, che sembra essersi autoimposta delle barriere invisibili. E' stato osservato come nella stessa scuderia o allevamento alcuni soggetti manifestano la sintomatologia e altri no. E' stato ancora osservato come i cavalli atleti selezionati da secoli per un tipo particolare di attività mostrino, a parità di sieropositività, una percentuale più bassa di casi clinicamente manifesti. Queste osservazioni permettono di avanzare

l'ipotesi secondo cui la resistenza del singolo soggetto allo stress sia il fattore chiave nella possibilità di emergenza della forma clinica. In quest'ottica, dunque, i cavalli più resistenti alla forma clinica della BD sarebbero quelli che, per selezione naturale o di razza, hanno sviluppato la maggior capacità di resistenza allo stress. Il periodo di incubazione per gli equini colpiti da infezione naturale può variare da 2 settimane a diversi mesi. La sintomatologia non è *standard* ma varia da soggetto a soggetto e nei cavalli coinvolge simultaneamente o in sequenza alterazioni del sensorio, della sensibilità, della motilità, della psiche e del funzionamento del sistema nervoso autonomo (SNA). Tra i sintomi più frequenti nella fase iniziale ricordiamo depressione, apatia, sonnolenza, *facies* stuporosa. L'evoluzione della malattia e il quadro sintomatologico dipendono in larga misura dall'estensione della reazione infiammatoria e dalle aree cerebrali colpite. In generale si può affermare che l'evoluzione della malattia avviene in circa tre settimane e che la morte segue in un numero di casi compreso tra 80 e 100%. Così, all'inizio della malattia si possono osservare alterazioni comportamentali: il soggetto mangia lentamente, si ferma all'improvviso mentre mastica e "fa tabacco", oppure compie movimenti masticatori a vuoto interrotti da frequenti sbadigli, e ancora spinge la testa contro un muro. Sempre nelle fasi iniziali può essere presente febbre ricorrente che resiste ai trattamenti farmacologici e protrusione del pene in assenza di minzione. Ancora si possono osservare movimenti ripetuti, letargia, sonnolenza, ipereccitabilità, paura, reazioni di aggressività a stimoli usuali. Le alterazioni comportamentali sono da riferire al danno funzionale del sistema limbico, sede di elezione della replicazione del virus. Sempre nelle fasi iniziali è possibile osservare ipocinesia, posture anomale, minore sensibilità cutanea e profonda, che risultano in una inadeguata risposta agli stimoli esogeni, nocicettivi e non, e perdita della propriocezione. Negli stadi avanzati della malattia diminuisce la risposta ai riflessi spinali e vengono compiuti movimenti ritmici ripetitivi con la testa, ipoestesia, atassia, disturbi dell'equilibrio, posture anormali. A seconda dell'interessamento dei nervi cranici si può avere anche disfagia, scialorrea (V nervo), diminuita tensione della lingua, aumento dei movimenti della lingua stessa (XII nervo), bruxismo e trisma mandibolare (V e VII nervo), paresi del facciale (Fig.11), nistagmo (III, IV, V, VI nervo), strabismo e miosi (III nervo). Negli stadi finali può comparire un torcicollo neurogeno, in taluni casi associato a movimenti di camminata ossessiva in circolo o movimenti "a orologio", detto anche "ballo dell'orso". Frequentemente i soggetti presentano anche convulsioni, in genere precedute da lievi tremori dei muscoli della testa, e costantemente accompagnate da un atteggiamento di pressione della testa contro pareti o altri oggetti, probabilmente dovuto

all'aumento della pressione nel liquido cerebrospinale nel sistema nervoso centrale interessato da risposta infiammatoria. Si nota comunemente la perdita del riflesso pupillare e la comparsa di strabismo, sintomi che generalmente precedono il coma (Codazza D. & Nativi D. 2005; Katz J. *et al* 1998).

Nelle forme acute di BD c'è sempre interessamento della retina e conseguente sviluppo di cecità. Studi morfologici del tessuto retinico di cavalli con Borna hanno evidenziato estese lesioni nella retina in tutti i cavalli colpiti (Dietzel J. *et al* 2007).



**Fig.11** Cavallo affetto da infezione naturale da Borna: presenta postura anomala e paralisi del nervo facciale (Richt J. & Rott R. 2001).

Circa il 50% degli animali colpiti dalla forma acuta sviluppano un certo grado di incapacità ad ingerire cibo e bevande, la qual cosa può limitare la durata della patologia. Nelle fasi finali della sintomatologia i soggetti colpiti difficilmente sono in grado di assumere cibi e bevande, sicché sviluppano un certo grado di iperbilirubinemia che causa colorazione itterica delle mucose. Sono stati descritti anche sintomi non neurologici, come pallore delle mucose, coliche ricorrenti e laminiti croniche senza apparente causa, ma ancora non è chiaro se tali sintomi siano direttamente causati dall'infezione col BDV (Codazza D. & Nativi D. 2005). Uno studio giapponese (Hagiwara K. *et al* 2002) ha messo in luce una differenza significativa tra la distribuzione dei disordini locomotori (tendinite del flessore superficiale, osteocondrosi cervicale, osteocondrite dissecante), tra soggetti sieropositivi e sieronegativi. I soggetti che sopravvivono alla fase acuta sviluppano alterazioni del comportamento, come sonnolenza e timore, idrocefalo, paresi, paraparesi e cecità permanente (Codazza D. & Nativi D. 2005; Katz J. *et al* 1998).

Dopo questa descrizione ci pare opportuno sottolineare l'estremo polimorfismo del quadro clinico. In presenza di sintomi neurologici le diagnosi differenziali da tenere presenti sono molte: infezione da EHV-1, rabbia, *tick-borne encephalitis*, altre encefaliti virali (*West Nile disease*, WEE, EEE, VEE), botulismo, tetano, meningiti batteriche, mieloencefaliti protozoarie e parassitarie, neoplasie, avvelenamenti, lesioni del sistema nervoso centrale, malformazioni congenite, intossicazioni anche da farmaci ed avvelenamenti. Particolare attenzione deve allora essere rivolta dagli acquirenti di cavalli, che devono essere in grado, in questo aiutati dal medico veterinario di fiducia, di valutare in modo differenziale gli anomali comportamenti degli equini sportivi che troppo spesso sono ricondotti alla somministrazione di sostanze ad attività stimolante (*doping*) o ad altre *noxae* patogene (Codazza D. & Nativi D. 2005; Richt J. & Rott R. 2001).

Nella pecora, altro ospite naturale, le manifestazioni cliniche sono riconducibili a *deficit* motori, seppure di entità minore rispetto al cavallo. Nelle fasi iniziali la sintomatologia è sovrapponibile a quella della *scrapie* (alterazioni comportamentali, l'animale si isola, smette di brucare senza ragioni apparenti, presenta iperestesia cutanea, atassia) ma la diagnosi differenziale è semplice: questa patologia evolve nell'arco di mesi, la BD invece nel giro di 4 -10 giorni porta la pecora a pigiare la testa contro i muri, a barcollare e digrignare i denti, l'andatura si rende difficoltosa e incerta con movimenti di maneggio fino al decubito laterale immobile o con movimenti di *pedalage*. La *scrapie* porta inevitabilmente a morte, la BD può risolversi da sé, residuando però con delle alterazioni comportamentali o del movimento per tutta la vita dell'animale. Altre diagnosi differenziali di cui tenere conto sono la Listeriosi e l'infestazione da larve di *Oestrus ovis* (Codazza D. & Nativi D. 2005; Vahelenkamp T *et al.* 2002)

È interessante notare come la sintomatologia della BD nella specie bovina sia sovrapponibile a quella della BSE: alterazioni comportamentali, del sensorio e del movimento, anche se si ricordi che alcuni soggetti positivi al prione manifestano solo un calo delle produzioni. La diagnosi differenziale deve comunque sempre considerare anche altre infezioni virali e batteriche del SNC (encefaliti erpetiche, listeriosi, clamidiosi, meningiti batteriche) (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Nel cane si impone la diagnosi differenziale con il cimurro e la rabbia, i cui agenti eziologici sono virus appartenenti all'ordine dei *Mononegavirales* come il BDV (Weissenbock H. *et al.* 1998).

Nel gatto si segnala la cosiddetta "*staggering disease*", ovvero una sindrome neurologica che racchiude in sé molteplici possibilità manifestative e molteplici cause, tra le quali solo di recente è stata annoverata anche la malattia di Borna. I felini colpiti manifestano barcollamento, atassia e paralisi, soprattutto a carico degli arti posteriori; altri sintomi osservati sono il cambiamento di comportamento, con miagolii più frequenti del normale, ansietà, depressione del sensorio, anoressia, iperestesia, ipersensibilità alla luce e al rumore. La maggior parte dei gatti muore nel giro di quattro settimane dall'esordio dei sintomi. E' stata descritta anche una forma clinica atipica con fascicolazioni muscolari e deficit propriocettivi. A differenza di quanto accade nella specie equina, l'espressione degli antigeni da parte del gatto è bassa (Berg A. *et al* 1998; Helps C. *et al* 2001; Lundgren A. *et al* 1995; Nakamura Y. *et al* 1996; Nakamura Y. *et al* 1999).

Negli struzzi BDV è stato osservato solo una paresi degli arti, essendo in questa specie interessato dalla reazione infiammatoria il midollo spinale più che il SNC (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Per le specie aviarie, dove si parla di ABV, essendo rinvenuto solo in soggetti positivi per PDD, la sintomatologia è sovrapponibile a tale patologia: disfunzioni del tratto gastroenterico quali disfagia, rigurgito, cibo non digerito nelle feci, dilatazione del proventriglio e ventriglio, segni neurologici come atassia e disturbi della deambulazione (Rinder M. *et al* 2009; Weissenbock H. *et al* 2009).

Negli altri animali l'infezione naturale da BDV raramente si manifesta clinicamente, ma qualora si presentino i sintomi essi sono sempre riferibili ad alterazioni comportamentali, del sensorio, o del movimento. La sintomatologia è sempre e comunque poliforme e la possibilità della BD va tenuta sempre in considerazione, soprattutto se si manifesta in un'area endemica (Codazza D. & Nativi D. 2005).

### 1.5.2 INFEZIONE SPERIMENTALE

Numerose specie sono state utilizzate per indagini sperimentali. Alcune di esse meritano di essere ricordate per aver permesso il conseguimento di importanti acquisizioni sui meccanismi patogenetici.

Coniglio: viene per lo più inoculato per via intracerebrale, ma sono praticabili anche altre vie quali intranasale, intraneurale, sottocutanea, orale e intraperitoneale. Previa

inoculazione per via intracerebrale, dopo un periodo di incubazione di 12-13 giorni, compaiono sintomi di abbattimento, ipereccitabilità, diminuzione dell'appetito, dimagrimento e debolezza del treno posteriore, sonnolenza, depressione, movimenti di maneggio, paralisi fino al sopraggiungere della morte. Al tavolo anatomico è possibile osservare congestione ed edema più o meno marcato delle meningi. L'esame istologico mette in evidenza encefalite e mielite acuta, disseminata e non purulenta, con infiltrati linfocitari perivascolari, proliferazione della neuroglia e lesioni degenerative delle cellule gangliari. Possono essere evidenti i corpuscoli di *Joest-Degen* nel nucleo delle cellule gangliari. Nel sangue sono presenti anche anticorpi neutralizzanti e gammaglobuline di produzione locale nel liquor (Castrucci G. 2002).

Topo: l'inoculazione per via intracerebrale provoca, sia nei neonati che nei soggetti adulti, una infezione persistente nel corso della quale il virus è dimostrabile nei neuroni, senza dar luogo a segni di malattia, ma stimolando la produzione di anticorpi specifici (Castrucci G. 2002).

Scimmia: dopo 4-7 settimane dall'inoculazione, *Macacus rhesus* presenta una sindrome di tipo retinico-encefalico con presenza di virus nella retina e nel cervello (Hagiwara K. *et al* 2008).

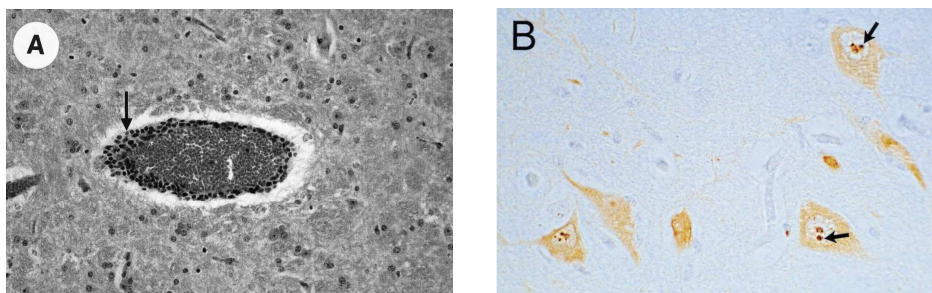
Ratto: *Lewis Rats* è sicuramente la specie di laboratorio più utilizzata e rappresenta un eccellente modello per lo studio di tale patologia. Anche nel ratto si ricorre preferenzialmente all'inoculazione intracerebrale. Un fattore particolarmente importante è legato all'età degli animali che può modificare completamente il comportamento della malattia. Il periodo di incubazione negli adulti è di 15-25 giorni, trascorsi i quali compaiono i segni di una encefalite necrotizzante autolimitante con mortalità variabile, caratterizzata da fenomeni infiammatori a livello retinico; la sintomatologia si presenta inizialmente con movimenti anomali, aggressività e iperattività, seguite da apatia e sonnolenza (Pletnikov M. *et al* 1999; Richt J. & Rott R. 2001; Stitz L. *et al* 1998). Negli animali che non muoiono i fenomeni infiammatori e necrotici regrediscono in circa due mesi, ma persiste lo stato di apatia che si protrae a lungo, spesso accompagnato dallo sviluppo di obesità (nel 5-10% dei ratti) di origine ancora sconosciuta (Herden C. *et al* 2000). Nei ratti neonati o nei soggetti immunocompromessi, l'infezione non induce né i sintomi né i fenomeni infiammatori riscontrati negli adulti; i ratti neonati infettati sperimentalmente non presentano la sintomatologia classica ma comunque manifestano alterazioni

comportamentali rilevanti e un minor sviluppo di alcune aree encefaliche. Sia negli uni sia negli altri si ha una risposta anticorpale con produzione, in certe condizioni, anche di anticorpi neutralizzanti, che in nessun caso, peraltro, influenzano la persistenza e la replicazione del virus nelle cellule nervose (Pletnikov M. *et al* 1999; Richt J. & Rott R. 2001; Stitz L. *et al* 1998).

La differenza sostanziale riscontrata con le infezioni naturali è la distribuzione delle lesioni, che nelle infezioni naturali è limitata a determinate aree mentre nelle infezioni sperimentali è più diffusa (Codazza D. & Nativi D. 2005). Alcuni autori comunque si mostrano critici verso l'interpretazione dei dati provenienti da infezioni sperimentali dei *Lewis rats*, sostenendo che i meccanismi patogenetici potrebbero essere differenti in corso di infezione naturale (Bode L. & Ludwig H. 2003).

## 1.6 LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

A livello patologico le infezioni sperimentali e naturali presentano caratteristiche sovrapponibili; le lesioni si riscontrano soprattutto a livello del SNC, in particolare a livello della sostanza grigia, nel midollo allungato e a livello retinico. Non si rilevano lesioni macroscopiche caratteristiche ma, sul piano istologico, si evidenzia una encefalomyelite acuta, disseminata e non purulenta, con modica degenerazione delle cellule gangliari, neuronofagia, iperproliferazione delle cellule astrocitarie e infiltrati linfocitari perivascolari (Fig.12), costituiti maggiormente da macrofagi, linfociti T (CD4+ e CD8+) e cellule del plasma. Nei neuroni, maggiormente a livello dell'ippocampo, si osserva la presenza di inclusi nucleari (inclusi di *Joest-Degen*: che si mostrano come una massa centrale circolare, compatta ed eosinofila, circondata da un alone chiaro, il tutto delimitato esternamente da una sottile linea scura) che se evidenti possono essere considerati patognomonici per BDV. Le lesioni prevalgono a livello della corteccia basale, del bulbo olfattorio, del nucleo caudato, del talamo, ippocampo e nelle aree periventricolari del midollo allungato; le alterazioni a livello del midollo spinale sono trascurabili, mentre sono assenti a livello del cervelletto (Gonzales D. *et al* 2000; Richt J. & e Rott R. 2001; Vahlenkamp T. *et al* 2002).



**Fig.12** A: sezione in paraffina della corteccia frontale di pecora all'esame istologico con colorazione ematossilina-eosina: notare la modesta infiltrazione linfocitaria perivascolare (Vahlenkamp T. *et al* 2002 modificata). B: neuroni dell'ippocampo positivi per l'immunofluorescenza: si possono notare i numerosi inclusi di Joest-Degen (Nowotny N. *et al* 2000).



## 1.7 PROFILASSI E TERAPIA

Per BDV non sono mai stati pensati piani di eradicazione e, in base alle caratteristiche e alla diffusione del virus, risulta poco verosimile ipotizzarli per il futuro. In caso di BD clinicamente manifesto valgono le normali pratiche igieniche utilizzate verso virus con *envelope* tenendo presente che il virus viene inattivato dopo 30 minuti a 56°C e dopo due giorni a 37°C; resiste fino a tre settimane a 20°C e per anni a -70°C. E' sensibile all'azione dei raggi UV e viene inattivato a pH 3 dopo 30 minuti a 4°C. Disinfettanti quali candeggina, sali quaternari d'ammonio, amminoacidi ad alto peso molecolare sono validi contro tale virus). Quindi la rigida applicazione delle norme di profilassi sanitaria (disinfezione, derattizzazione e isolamento del soggetto colpito) assicurano la limitazione della propagazione e del contagio (Castrucci G. 2002).

All'inizio degli anni '80 in Germania venne impiegato un vaccino vivo attenuato ma la pratica venne sospesa nel '92 non solo avendone constatata la mancata efficacia, ma soprattutto a causa dell'insorgenza della patologia in alcuni dei soggetti vaccinati (Codazza D. & Nativi D. 2005). Successivamente diversi studi hanno aperto la porta al ruolo di prevenzione che possono rivestire gli anticorpi neutralizzanti ed al loro possibile futuro impiego per lo sviluppo di un vaccino; ricordiamo come il trasferimento di immunità passiva mediante inoculo di anticorpi anti BDV in *Lewis rats* immunocompromessi (dove la diffusione del virus riguarda oltre che il SNC anche tessuti extra-nervosi) abbia impedito la diffusione del virus in tessuti al di fuori del SNC (Stitz L. *et al* 1998). In un altro studio è stato provato come il trasferimento passivo di cellule T CD4+ specifiche per BDV (*cells culture-attenuated* BDV) ad alti dosaggi abbia impedito lo sviluppo della sintomatologia e delle lesioni istopatologiche, inducendo una rapida comparsa dell'immunità umorale, cosa che invece non avviene se la somministrazione avviene a bassi dosaggi dove si sviluppa la severa encefalomielite e i segni clinici conseguenti (Furrer E. *et al* 2001; Oldach D. *et al* 1995; Richt J. & Rott R. 2001).

*Parapoxivirus Orf virus* è considerato un promettente candidato come vettore per la costituzione di nuovi vaccini. Il virus ricombinante da esso derivato (D1701-VrVp40) che esprime la nucleoproteina p40 di BDV, rappresenta un importante antigene per l'induzione della risposta immunitaria verso BDV. *Lewis Rats* di 4-5 settimane sono stati immunizzati mediante inoculazione intramuscolare di D1701-VrVp40 con tre dosi a distanza di due

settimane, e sono poi stati infettati per via intracerebrale con BDV. Si è visto che tale immunizzazione è in grado di sviluppare un'elevata risposta anticorpale specifica capace di impedire la diffusione e l'eliminazione del virus dopo inoculazione intracerebrale, la manifestazione della forma clinica, e riducendo lo sviluppo delle lesioni istopatologiche. Inoltre, si è potuto verificare che, dopo 4 e 8 mesi i soggetti trattati presentavano ancora immunizzazione verso BDV. Questi risultati aprono la strada verso lo sviluppo di un vaccino ideale in grado di indurre un'efficacia e duratura immunizzazione con riduzione dell'eliminazione virale e delle lesioni cerebrali (Henkel M. *et al* 2005).

Attualmente per il trattamento di BDV viene utilizzata *Amantadine sulphate*, un farmaco utilizzato per il trattamento dell'influenza A, per il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla, in caso di lesioni post traumatiche del SNC e nelle forma di demenza. Agisce influenzando il sistema dopaminergico, serotonergico e noradrenergico e i recettori NMDA. L'uso di tale sostanza sia in umani che in animali ha condotto ad un miglioramento della sintomatologia clinica correlata alla depressione. La terapia con la molecola in oggetto risulta molto efficace in corso di semplice infezione da BDV in atto o di malattia manifesta, ed in Germania viene largamente usato. La terapia non elimina il virus dall'organismo ma riesce a ridurre l'attività replicativa, agendo quindi come virus-statico, garantendo nella maggior parte dei casi la remissione della sintomatologia. Qualora si intraprenda la terapia troppo precocemente, ovvero prima della replicazione virale, l'effetto non si nota se non dopo un lungo periodo di tempo. Per questo motivo è bene iniziare la terapia dopo uno o due mesi dalla comparsa degli antigeni nel sangue. Indipendentemente dalla comparsa dei sintomi in genere si può iniziare la terapia quando nel sangue compaiono gli immunocomplessi. Il farmaco, utilizzato per BDV negli equidi, prevede la somministrazione per via orale secondo il seguente schema:

- 1° giorno: 500 mg *Amantadine sulphate* (750 mg se la viremia è molto alta)
- 2° giorno: 500 mg *Amantadine sulphate* (1000 mg se la viremia è molto alta)
- 3° giorno: 750 mg *Amantadine sulphate* (1000 mg se la viremia è molto alta)
- 4-7° giorno: 1000 mg *Amantadine sulphate* (1500 mg se la viremia è molto alta)
- 8-30° giorno: 1500 mg *Amantadine sulphate* (2000 mg se la viremia è molto alta)
- 31-90° giorno: 1500 mg *Amantadine sulphate* (2000 mg se la viremia è molto alta); in caso la sintomatologia scompaia e il cavallo recuperi una buona forma fisica, il dosaggio dal giorno 31 al 90° può essere ridotto a 1000 mg.

La durata complessiva della terapia non è mai inferiore alle 12 settimane, ma se il livello di viremia è alto la durata si aggira attorno ai 6 mesi e a volte si protrae anche oltre. La durata non può quindi essere decisa a priori, ma si valuta in relazione alla viremia valutata con prelievi ematici mensili. L'80% dei cavalli risponde positivamente alla terapia, che non presenta effetti collaterali noti. Bisogna però sottolineare che essa si deve svolgere in condizioni di assoluto riposo del soggetto trattato: lo stress è un importante fattore nella replicazione virale e può ridurre gli effetti del farmaco. Quando il cavallo manifesta apatia o si mostra spaventato e difficile da avvicinare è bene combinare la terapia con un trattamento sintomatico antidepressivo (Nortriptylin 50-100 mg) e con uno stabilizzante dell'umore (Carbamazepina 100-400 mg) per un periodo che può andare dalle 8 settimane ai 6 mesi (Bode L. *et al* 1997; Codazza D. & Nativi D. 2005).

Anche altre sostanze sono state studiate per il trattamento di BDV; studi in vitro hanno dimostrato l'effetto inibitore sulla replicazione virale della Ribavirina, ma ancora non ne è stata dimostrata l'efficacia in vivo. Altra molecola studiata è 1- $\beta$ -DArabinofuranosylcytosine (Ara-C), un noto inibitore della DNA polimerasi comunemente usato nel trattamento delle leucemie; studi sperimentali sia in vitro che in vivo hanno dimostrato la sua capacità inibitoria a livello di replicazione di BDV, prevenendo l'infezione persistente del SNC e lo sviluppo della sintomatologia clinica. Questi risultati aprono la strada al futuro sviluppo di terapie antivirali verso BDV (Bajramovic J. *et al* 2002).

## **1.8 INFEZIONE NELL'UOMO**

Nell'uomo i disturbi psichiatrici possono derivare da un ampio gruppo di malattie diverse con eziologia eterogenea (predisposizione genetica, esposizione allo stress, fattori ambientali). È stato suggerito che alcune infezioni zoonotiche possano influenzare il decorso di alcuni disturbi psichiatrici, in particolare *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi* e il virus della malattia di Borna (BDV). Come già detto Borna virus colpisce il sistema nervoso centrale (CNS), e la distribuzione intracerebrale delle lesioni nell'uomo ricalca quella osservata negli animali con prevalente interessamento del sistema limbico (sede dell'elaborazione della sfera emozionale e della memoria), ed è associato allo sviluppo di anomalie comportamentali, dell'umore e cambiamenti cognitivi. Durante l'infezione, BDV altera il SNC con diversi meccanismi: attraverso il legame di proteine virali

con i recettori dei neurotrasmettitori, in particolare quelli dopominirgici (collegati a disturbi neuropsichiatrici quali schizofrenia, dipendenze e disturbi extrapiramidali), e indirettamente attraverso la risposta immunitaria e le reazioni infiammatorie che si sviluppano. Entrambe le risposte comportano alterazioni dello stato d'animo, del comportamento e cambiamenti emotivi negli individui infetti, e possono essere associate a disturbi psichiatrici nell'uomo (disturbi affettivi, dipendenze e disturbi psicotici) (Bode L. & Ludwig H. 2003).

Un aumento del tasso di infezione per BDV è stato valutato in pazienti psichiatrici (con diagnosi di depressione, disturbo affettivo bipolare e schizofrenia) e in pazienti immunocompromessi, soprattutto quelli con immunosoppressione cellulare (tra cui pazienti HIV positivi) (Bachmann S. *et al* 1999; Bode L. *et al* 1988; Rackova S. *et al* 2010).

Anticorpi specifici per BDV furono trovati per la prima volta in sieri umani nel 1976 in un paziente affetto da epilessia e disturbi psichiatrici. Nel corso degli anni che seguirono sono stati testati sieri e liquor di migliaia di pazienti psichiatrici in Germania, Svizzera, Europa, Giappone, USA, Australia, Africa, Brasile, Taiwan, Thailandia, Polonia, Svezia e Repubblica Ceca. Nel 1995 si riuscì ad ottenere il primo isolamento di RNA virale da leucociti circolanti e polimorfonucleati in pazienti psichiatrici. Sono risultati sieropositivi pazienti affetti da schizofrenia, sindrome da affaticamento cronico, sindrome maniaco depressiva, depressione ricorrente, attacchi di panico, distrofia muscolare e morbo di *Parkinson* (Bode L. *et al* 1995; Bode L. & Ludwig H. 2003; Chen C. *et al* 1999a/b; Cotto E. *et al* 2003; Iwahashi K. *et al* 1997; Iwata Y. *et al* 1998; Kitani T. *et al* 1996; Lieb K. *et al* 1997; Rott R. *et al* 1985; Salvatore M. *et al* 1997; Sauder C. *et al* 1996; Waltrip I. *et al* 1995; Yamaguchi K. *et al* 1999). I pazienti psichiatrici nei quali più frequentemente si rileva sieropositività per BDV sono quelli affetti da *major depressive disorder*, che nelle forma acuta è caratterizzata da indifferenza per qualsiasi cosa, incapacità di provare piacere per i normali eventi della vita, umore depresso, ritardo psicomotorio, pensieri suicidi, numero eccessivo di ore di sonno, impossibilità di concentrarsi e deficit mnemonici. Questa molteplicità di possibili manifestazioni potrebbe essere il risultato di molti fattori: le aree cerebrali interessate, l'entità della risposta infiammatoria, l'immunocompetenza del soggetto infettato, la sua eventuale predisposizione genetica e la presenza di cause di stress. Inoltre viene sempre più accettata l'ipotesi che BDV determini delle alterazioni funzionali transitorie a livello di neurotrasmettitori più che alterazioni strutturali, organiche, la quale spiegherebbe la ricorrenza dei sintomi, specialmente nei disordini dell'umore come il *major depressive disorder*, che spontaneamente va incontro a periodi di remissione e riacutizzazione (Codazza D. & Nativi D. 2005).

La positività per Borna virus in pazienti psichiatrici varia molto nei diversi lavori svolti. Queste differenze possono essere causate dall'uso di metodiche di laboratorio e materiali biologici differenti, dalla diagnosi psichiatrica, dalla gravità della psicopatologia dei pazienti e dalle regioni geografiche indagate (Allegato 2).

Le prime individuazioni di anticorpi, eseguite da Rott e colleghi nei pazienti psichiatrici nel 1985, utilizzavano il metodo dell'IFA (immunofluorescenza), con positività per Ab dell' 1-4% dei pazienti psichiatrici e nel 20% dei pazienti con depressione acuta. Negli anni successivi con lo sviluppo dell' ELISA per la ricerca di Ag, CIC e Ab (ELISA triplice), è emersa una maggior positività nei pazienti psichiatrici (tra 50% e il 90%), rispetto agli individui sani (fra il 20% e 30%). La forza e la durata dei CIC può essere correlata con la gravità dei sintomi (maggiore quantità di BDV CIC e Ag sono stati rilevati in pazienti con psicopatologia grave rispetto ai livelli più bassi nei pazienti con sintomi lievi). Diversi altri lavori non hanno però rilevato positività per BDV nei pazienti psichiatrici o con patologie sopra citate, e non confermano quindi la correlazione tra BDV e tali patologie (Lieb K. *et al* 1997; Rackova S. *et al* 2010; Richt J. *et al* 1997). Come già osservato, la mancata standardizzazione delle metodiche sierologiche ha aperto e mai chiuso la *querelle* circa il valore da attribuire ai risultati ottenuti dai diversi laboratori (Codazza D. & Nativi D. 2005). Analogamente a quanto evidenziato in felini affetti da FIV rispetto a soggetti sani, la prevalenza di infezione nei pazienti HIV positivi è nettamente superiore ai pazienti di controllo (Bachmann S. *et al* 1999; Bode L. *et al* 1988; Rackova S. *et al* 2010). Una spiegazione possibile potrebbe essere riconducibile alle anomalie o deficit funzionali che coinvolgono i linfociti T in corso di infezione da HIV, laddove è noto che la risposta infiammatoria in corso di BDV è appunto mediata prevalentemente dai linfociti T (Cotto E. *et al* 2003). In relazione a queste considerazioni sono stati eseguiti alcuni studi circa l'aumento o meno della sieropositività per BDV in relazione a situazioni di compromissione immunitaria legata allo stress, come accade nel periodo di disintossicazione di soggetti con dipendenza da alcol o da droga. Sono stati esaminati pazienti dipendenti per la presenza di BDV CIC nel siero mediante ELISA all'inizio di disintossicazione, e dopo otto settimane di astinenza, e su di un gruppo di donatori di sangue come soggetti di controllo. E' stata rilevata una positività nel 36,59% dei pazienti tossicodipendenti al giorno 0 e nel 42,86% al giorno 56. Il gruppo di controllo era positivo nel 37,3%. Tuttavia, da un punto di vista statistico pazienti dipendenti non avevano livelli significativamente più alti di BDV CIC rispetto al gruppo di controllo. I livelli più elevati di BDV CIC sono stati rilevati in pazienti con più bassi livelli di GGT (gamma-glutamyl transferasi) e ad un'età inferiore. Inoltre non

è stata trovata alcuna associazione tra positività BDV CIC e altre caratteristiche anamnestiche e demografiche (Rackova S. *et al* 2010).

In relazione all'età dei soggetti si è potuto notare come la sieropositività sia maggiore nei bambini rispetto agli adulti. Uno studio di sieroprevalenza effettuato in Italia (Sicilia) ha mostrato una sieropositività circa doppia tra i bambini rispetto agli adulti sia dell' Italia che di altri paesi. Nel medesimo studio sono stati testati anche 17 gatti domestici e 7 cavalli oltre a 258 bambini (tra 0-14 anni); per lo studio è stata utilizzata un ELISA triplice. 30/258 (50,4%) dei bambini sono risultati positivi per BDV CIC; nessuna differenza è risultata significativa per il sesso. Quando i campioni positivi sono stati valutati in relazione all'età, è emerso che i bambini con età compresa tra 1-4 anni mostravano una maggior prevalenza, in particolare in riferimento al primo anno di vita, mentre negli anni successivi la prevalenza è diminuita. In Sicilia, come in Italia, BDV infetta i bambini maggiormente nei primi anni di vita, ma sono emerse delle differenze con le altre regioni italiane. In Sicilia la prevalenza dell'infezione è risultata inferiore rispetto al livello nazionale. In particolare, sotto un anno di età nessun bambino è stato trovato positivo (mentre più di un sondaggio condotto in diverse regioni in Italia hanno mostrato che più del 70% dei bambini sotto l'anno di età risultava positivo). Il 12% dei gatti sono risultati positivi; si tratta di una scoperta molto interessante, perché è noto che tali animali domestici sono spesso in stretto contatto con i bambini, ma la prevalenza di infezione dei gatti siciliani non spiega comunque il tasso di infezione trovato nei bambini. Tutti i cavalli, ad eccezione di un animale *borderline*, sono invece risultati negativi (Patti M. *et al* 2008).

Alcuni autori ritengono che sia ancora da chiarire una questione fondamentale: se la sieropositività umana è data dal medesimo BDV che infetta gli animali o piuttosto da un virus non ancora identificato che ha in comune con esso delle sequenze geniche e che, per così dire, inganna le tecniche diagnostiche in uso. In ogni caso non si può negare l'evidenza dell'esistenza di un virus uguale o molto simile al BDV animale, che infetta l'uomo, né la prevalenza anticorpale significativamente più alta riscontrata nei pazienti psichiatrici rispetto ai sani. Ciò detto è bene rimarcare come la schizofrenia ed altri disordini psichiatrici ad oggi non siano stati posti in relazione certa con nessuna infezione virale e comunque esistono diverse ragioni per cui la relazione infezione virale-sviluppo di disordini psichiatrici sia difficile da provare:

- L'agente eziologico potrebbe infettare il soggetto durante la vita intrauterina o nell'immediato periodo postnatale e poi scomparire.

- Un'agente patogeno assai comune potrebbe indurre malattia attraverso lo sviluppo di una reazione non comune, come ad esempio il virus del morbillo che è in grado di causare panencefalite subacuta sclerosante. In questo caso la difficoltà starebbe nel fatto che la maggioranza della popolazione risulterebbe sieropositiva.
- Un agente eziologico sconosciuto o raro potrebbe essere il responsabile e potrebbe non essere identificato in quanto non ancora disponibili tecniche diagnostiche sensibili per esso.
- Potrebbe essere necessario l'intervento di due distinti agenti eziologici per determinare la malattia.
- E' possibile che l'agente eziologico in questione determini l'insorgenza della malattia solo in determinate condizioni, come l'età del soggetto all'infezione, la localizzazione del patogeno in una determinata area encefalica o la predisposizione genetica del soggetto colpito.
- L'agente eziologico può essere implicato solo in una piccola parte dei casi di disordini psichiatrici, se si considera l'assunto che esse vengono considerate come patologie multifattoriali.
- L'agente eziologico potrebbe essere incorporato nel genoma dell'ospite.
- Infine, è noto come l'identificazione di un agente eziologico (antigene o genoma) a partire dall'encefalo sia estremamente difficile, anche in caso di agenti eziologici conosciuti e in presenza di quadri patologici noti, nei casi in cui la concentrazione del patogeno sia bassa o esso abbia una distribuzione non omogenea nell'encefalo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

A lungo si è dibattuto circa l'eventuale potenziale zoonotico del BDV, le pubblicazioni più recenti tendono ad escludere che il virus possa passare all'uomo ma postulano piuttosto che l'uomo sia, al pari di altri ospiti, egli stesso un ospite e che la trasmissione del BDV nella specie umana segua le stesse modalità intraspecifiche descritte nella specie equina (Bode L. & Ludwig H. 2003). Si segnala tuttavia il risultato di un lavoro giapponese che illustra una sieroprevalenza significativamente più alta per BDV (2,6-14,8%) in donatori di

sangue provenienti dalla regione di Hokkaido, dove viene allevato il 90% dei trottatori, rispetto a donatori di sangue provenienti da una città (1%) (Takahashi H. *et al* 1997).

In sintesi non è ancora possibile dimostrare la reale correlazione tra BDV e patologie psichiatriche dell'uomo, né è ancora chiaro se esista o meno la possibilità per Borna di essere considerato un agente causa di zoonosi. Sarebbe importante svolgere contemporaneamente degli studi di sieroprevalenza con un maggior numero di persone, bambini e loro animali domestici (Patti M. *et al* 2008).

## **1.9 DIAGNOSI**

### 1.9.1 INTRA VITAM

La diagnosi *intra vitam* per BD può trovare conferma solo se:

- esistono rilievi clinici di segni neurologici
- sono dimostrati anticorpi specifici nel siero e/o nel LCS (liquido cerebro spinale)
- ci sono alterazioni citologiche e biochimiche del LCS

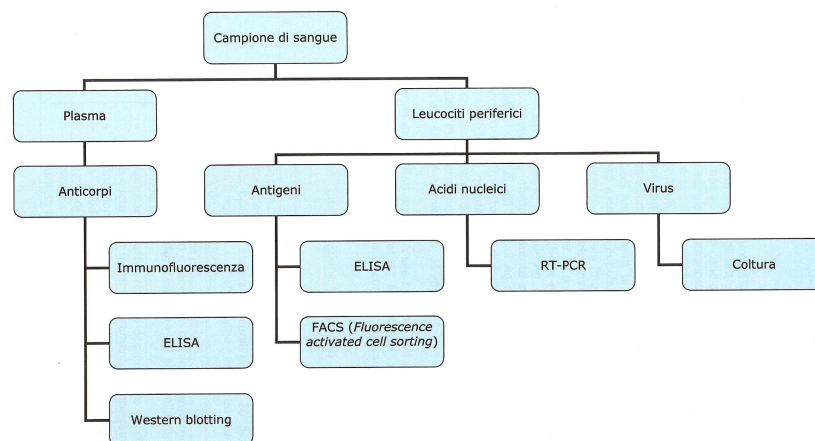
Il sospetto viene avanzato qualora ci si trovi di fronte ad un animale con sintomatologia neurologica, soprattutto se in area riconosciuta endemica. La conferma non può prescindere dall'utilizzo di esami collaterali, quali l'esame microscopico del LCS e la sierologia che ricerca sia nel LCS che nel siero anticorpi monoclonali o policlonali verso il BDV. Le tecniche sierologiche attualmente in uso sono *western blotting* (WB), ELISA, IFA e RT-PCR (Fig.13).

I parametri ematologici e biochimici sono di scarso aiuto poiché solitamente rientrano nei limiti fisiologici; l'iperbilirubinemia è sempre presente ma ancora non se ne conoscono le cause. L'esame del LCS, nella fase acuta della malattia, rileva un lieve aumento della quantità proteica, reazione di Pandy sempre positiva e pleocitosi linfo-monocitica; nei casi cronici i parametri citati non presentano variazioni di sorta se non un elevato aumento del lattato (Richt J. & Rott R. 2001).

Per quanto riguarda la sierologia, è bene ricordare che in corso di infezione naturale gli anticorpi sono generalmente a basso titolo e non sono presenti per tutta la durata della vita dell'animale. In corso di infezione sono riscontrabili periodi in cui gli anticorpi non risultano *detectable* mentre in altri periodi il loro livello sale, questo in relazione con



l'espressione del genoma virale. Nei casi acuti la ricerca anticorpale porta sempre a risultati positivi, mentre nei casi iperacuti non sempre si riescono ad isolare. L'impiego della sierologia, (IFA, ELISA, WB), è stata, ed è tutt'ora, al centro di controversie circa l'attendibilità dei vari test proposti, poiché i risultati ottenuti dai vari gruppi di ricerca molto spesso non sono ripetibili. La mancanza di standardizzazione risulta essere il principale tra gli ostacoli per la creazione di una banca dati omogenea ed attendibile, sia per i sieri animali che umani (Codazza D. & Nativi D. 2005). E' stato pubblicato uno studio in cui è stato fatto un resoconto di *screening* effettuato su 158 sieri equini pervenuti in laboratorio per controlli di *routin*. I campioni sono stati inizialmente sottoposti a metodi di WB, i positivi sono poi stati testati con IFA ed ELISA per la conferma diagnostica. Le tre analisi sono state eseguite in tre diversi laboratori, in nazioni diverse, ed hanno condotto a risultati assai contrastanti che pongono un serio interrogativo circa l'affidabilità delle metodiche utilizzate (Galabru J. *et al* 2000).



**Fig.13** possibilità diagnostiche di laboratorio (Codazza D. & Nativi D. 2005 modificata).

### 1.9.2 POST MORTEM

La diagnosi *post mortem* può essere effettuata mediante esame istologico, La maggior concentrazione virale si osserva nel sistema limbico, ma comunque il virus si può trovare anche in altre sedi del SNC. Il rischio di falsi negativi è intrinseco all'esame istologico, considerando la bassa percentuale di neuroni infettati interessati sul totale. L'esame istologico inoltre non sempre presenta le lesioni caratteristiche già descritte; ricordiamo

però che il rinvenimento di corpi di *Joest-Degen*, seppur raro, sia da considerarsi patognomico (Richt J. & Rott R. 2001).

La PCR vanta un altissima sensibilità ma pecca di specificità, in quanto può dare dei falsi positivi dovuti ad errori procedurali o accidentali da contaminazione in laboratorio; questo aspetto è talmente presente da aver messo in discussione i risultati di numerosi studi, ottenuti con PCR, da alcuni autori. L'isolamento virale è possibile ma laborioso, e richiede numerosi passaggi su linee cellulari precise (Codazza D. & Nativi D. 2005).

La diagnosi di BD è dunque difficile, e difficile è interpretare i risultati delle analisi in assenza di standardizzazione delle metodiche: ogni laboratorio ha una sua procedura, sia nella sierologia che nella ricerca dell'agente stesso. Di fatto gli ultimi anni sono stati segnati da accese discussioni tra i vari gruppi di lavoro, il che non fa altro che rimarcare la necessità di una standardizzazione delle metodiche accettate a livello internazionale (Taieb O. *et al* 2001).

## ***CAPITOLO II: OBIETTIVI DEL LAVORO***

---

L'obiettivo generale dell'indagine era teso alla verifica dell'eventuale presenza di infezione da Virus della Malattia di Borna in equidi residenti in aree del territorio Nazionale sino ad oggi ritenute indenni ma a rischio di introduzione dell'infezione per contiguità geografica con l'Austria, Paese nel quale negli ultimi anni è stata confermata la presenza del virus nei cavalli.

Per raggiungere tale obiettivo è stato condotto uno studio pilota finalizzato a rilevare la presenza di sieropositività nei confronti della infezione da Virus della Malattia di Borna negli equidi delle province di Trento e Bolzano. Trattandosi di uno studio condotto mediante diagnosi indiretta, i risultati ottenuti hanno carattere presuntivo rispetto alla reale e pregressa circolazione virale in queste Province. Tuttavia, la dimostrazione della presenza di sieropositività, sporadiche o diffuse, potrà fornire utili elementi di valutazione circa l'opportunità di condurre studi più approfonditi che abbiano come scopo la stima della sieroprevalenza per virus Borna e l'eventuale adozione di misure di monitoraggio e sorveglianza basate su idonei criteri di rappresentatività per le popolazioni di equidi residenti nelle due Province. In conclusione, l'obiettivo specifico del presente studio pilota è stato raggiunto attraverso la selezione di un campione di equidi, sottoposti a controllo sierologico nel 2009/2010 nell'ambito delle attività previste dal Piano di sorveglianza nazionale per l'Anemia Infettiva degli equidi, che è stato analizzato anche per la presenza di anticorpi nei confronti del virus della Malattia di Borna.

## ***CAPITOLO III: MATERIALI E METODI***

---

### **3.1 CAMPIONAMENTO**

La scelta della modalità di selezione dei soggetti da campionare si è avvalsa della consulenza del Centro Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana (nelle persone dei Dott. Gian Luca Autorino e Dott. Marcello Sala). Dai dati desunti dal Database 2007 dell'Anemia Infettiva detenuto dal CRAIE di Pisa, unica fonte dati verosimilmente completa e rappresentativa della reale numerosità della popolazione di equidi presente (non essendo ancora disponibili i dati centralizzati dell'anagrafe equina nazionale), è possibile stimare la seguente popolazione di riferimento per le Province di Trento e Bolzano:

***Tabella 1***

<i>Provincia</i>	<i>N° equidi testati per AIE 2007</i>	<i>N° di insediamenti</i>
TN	670	257
BZ	1.156	192
<b>Totale</b>	<b>1.826</b>	<b>449</b>

Per raggiungere più facilmente gli scopi dello studio, è stato particolarmente importante concentrare i controlli sierologici tra gli equidi maggiormente a rischio di esposizione per una eventuale infezione da virus Borna, ossia i capi detenuti in condizioni “**rurali**”, soggetti con **possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto** e cavalli **stanziali**. In effetti, al fine di poter ascrivere le eventuali sieropositività riscontrate ad infezioni effettivamente avvenute in loco e quindi poter ipotizzare induttivamente una effettiva circolazione virale, è stato fondamentale procedere al controllo sierologico di **equidi residenti stabilmente** da più anni e non soggetti a movimentazione (per allenamento, competizioni ecc.). Non potendo ricostruire la storia residenziale degli equidi presenti nelle due Province sulla base del Database AIE, è stato necessario delegare la scelta dei soggetti da campionare agli operatori (veterinari delle ASL e personale dell'IZS delle due regioni) che hanno effettiva conoscenza del territorio, sulla base di una valutazione sicuramente arbitraria ma certamente più circostanziata e adeguata alle finalità dello

studio. La scelta di operare il controllo, prioritariamente, su equidi detenuti in condizioni rurali e/o all'aperto è basata sulle evidenze prodotte da alcuni studi condotti in Europa i quali descrivono il possibile ruolo quale serbatoio del virus di un insettivoro , **Crocidura ventrebianco** (*Crocidura leucodon*), mammifero soricomorfo della famiglia dei Soricidi, diffuso in Europa e presente anche in Italia (Hilbe M. *et al* 2006).

Sulla base dei denominatori riportati in Tabella 1, per ogni Provincia è stato calcolato un campione necessario a rilevare, con una probabilità del 95%, almeno un equide positivo nel caso la prevalenza reale di soggetti positivi sia pari o superiore al 2% (Ipotesi nulla). Nel caso nessun soggetto risulti positivo si potrà concludere, accettando l'ipotesi alternativa, che la prevalenza dell'infezione è inferiore al 2%. In ogni caso, la numerosità campionaria calcolata (Tabella 2.) potrà consentire di operare una stima, seppure grezza, della prevalenza, utile a fini conoscitivi.

Sulla base di tali assunti è stato quindi calcolato il seguente campione di equidi da sottoporre ad esame sierologico per BORNA, su base provinciale:

**Tabella 2:** campioni di equidi da testare (LC 95% - soglia di prevalenza > 2%)

<i>Provincia</i>	<i>Denominatore ( Pop. Target )</i>	<i>Numerosità campionaria (equidi da testare)</i>	<i>Frazione campionaria %</i>
TN	670	<b>137</b>	21
BZ	1.156	<b>140</b>	12
Totale	1.826	<b>277</b>	

### 3.1.1 CRITERI DI SELEZIONE DEGLI EQUIDI TESTATI

Come specificato in precedenza, ai fini del raggiungimento della numerosità campionaria richiesta, sono stati selezionati equidi:

- detenuti in condizioni “**rurali**”
- con **possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto**
- **residenti stabilmente**

La selezione dei campioni aventi tali caratteristiche è stata operata sia sui sieri già stoccati per AIE, sia su sieri di nuovo conferimento nell'ambito del Piano AIE 2009/2010, avendo l'accortezza di distribuirli in maniera uniforme rispetto alle aziende (strutture) presenti sui rispettivi territori di competenza nonché all'area di provenienza (comune). **E' stato selezionato un numero massimo di 4 sieri (equidi) per azienda.**

**Nota:** in questa fase, la randomizzazione dei soggetti da campionare non viene ritenuta fondamentale, in quanto lo scopo è limitato alla verifica della presenza dell'infezione, privilegiando le categorie di equidi potenzialmente più a rischio (categorie per le quali la possibilità teorica di reclutare soggetti positivi è maggiore). Si tratta quindi di operare nell'ambito del "migliore scenario" possibile al fine del reclutamento dei "casi". Tale scenario, quindi, rappresenta un approccio conservativo in grado di offrire le maggiori probabilità di individuare la presenza dell'infezione e, in caso di completa negatività del campione, di poter escludere la sua presenza con un elevato livello di confidenza. Un approccio più sistematico potrà essere invece utilizzato in un eventuale studio successivo finalizzato alla stima della sieroprevalenza territoriale, attraverso l'adozione di un appropriato disegno dello studio in grado di garantire piena rappresentatività del campione.

#### **Schede di prelievo dei campioni.**

Per ogni campione o serie di campioni (massimo 4 per azienda) provenienti da una singola azienda è stata compilata una scheda accessoria (vedi allegato 4)

Dei 137 sieri raccolti nella provincia di Trento il 70% è rappresentato da soggetti di sesso femminile e il 30% da soggetti di sesso maschile (comprendenti sia maschi interi che castroni). Il 38.6% ha età compresa tra i 16-25 anni, il 31.4% tra i 6-15 anni e il 30% tra 1-5 anni. Le razze maggiormente rappresentate sono Avelignese (29.6%), Quarter Horse (25.5%), Paint Horse e incroci ( 9.5% rispettivamente). I soggetti vivono principalmente in area considerata campagna (73%), mentre una minor parte (27%) vive in aree considerate urbane. Inoltre il 57.7% vive in zone di mezza montagna (tra i 500-1000 metri di altitudine sul livello del mare), il 18.2% in zona di collina (300-500mt), il 12.4% in zona di montagna (>1000mt) e 11.7% in pianura (<300mt). (Sono state considerate zone di campagna le aree con una superficie di terreno aperto al di fuori o comunque lontano dai centri urbani o con qualche centro abitato, perlopiù costituito da piccole comunità o da terre estese libere che vengono coltivate o lasciate incolte, mentre la zona urbana per definizione è rappresentata dall'insieme di edificazioni che formano una città) (vedi Allegato 3 sezione TN).

Dei 140 sieri raccolti nella provincia di Bolzano il 67.2% è rappresentato da soggetti di sesso femminile, il 32.8% da soggetti di sesso maschile (comprendenti sia maschi interi che castroni). Il 48.6% ha età compresa tra i 6-15 anni, il 40% tra i 1-5 anni, il 10.8% tra

16-25 anni e lo 0.8% con età superiore ai 26 anni. La razza maggiormente rappresentata è quella degli Avelignesi (69.3%). I soggetti vivono principalmente in area considerata campagna (86.4%); bisogna considerare che in questa regione è ancora molto presente l'allevamento allo stato semi-libero dei soggetti Avelignesi e la pratica dell'alpeggio estivo. Solo il 13.6% vive in aree considerate urbane. Inoltre il 46.4% vive in zone di mezza montagna, il 45% in zona montagna, il 5.7% in zona di collina e il 2.8% in pianura (vedi Allegato 3 sezione BZ).

Sono stati selezionati solo i soggetti considerati residenti stabilmente (ovvero con movimenti limitati all'interno della regione indagata), con possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto e considerati rurali (anche i cavalli che vivono in aree urbane si trovano alla periferia dei centri abitati e sono in contiguità con zone di campagna, pascolo o bosco).

I sieri testati sono stati selezionati anche in relazione alla stagione di prelievo (ovvero sono stati selezionati quelli del periodo compreso tra l'inizio della primavera e l'inizio dell'estate), in quanto è noto che la patologia emerge a livello clinico soprattutto, ma non esclusivamente in tale periodo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

### **3.2 SIEROLOGIA**

Per il presente studio abbiamo utilizzato la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IFA), per la ricerca degli anticorpi nel siero di equidi, eseguita presso i laboratori di Virologia Speciale (struttura Complessa 6) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro). Tale metodica, in uso presso il Centro di Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana, è stata scelta come metodica di elezione in quanto ritenuta *gold standart* per la ricerca degli anticorpi nei confronti del BDV.

Non è stato effettuato un test di *screening* in ELISA poiché il numero di campioni analizzati non ha reso necessario l'uso di tale metodo. Inoltre, poiché tale metodo ELISA non è commerciale, ma *in house*, la variabilità delle performance è elevata. Si è quindi ritenuto controproducente ai fini dell'indagine lo sviluppo e la validazione di tale metodo.

### 3.2.1 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IFA)

L'allestimento dei vetrini positivi per virus BD è stato effettuato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana. Ogni vetrino è costituito da 10 pozzetti con monostrato di cellule infettate con BDV (Mosquito larvae, *Aedes albopictus*, clone C6/36, ATCC-CRL 1660). Il monostrato cellulare è stato fissato al vetrino con Acetone 96%. I vetrini così allestiti sono stati conservati congelati (-20 °C) fino all'esecuzione della prova (Fig.14).

Anticorpo monoclonale specifico nei confronti del virus BD è stato fornito dal Centro di Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana



**Fig.14** Vetrino utilizzato per l'IFA

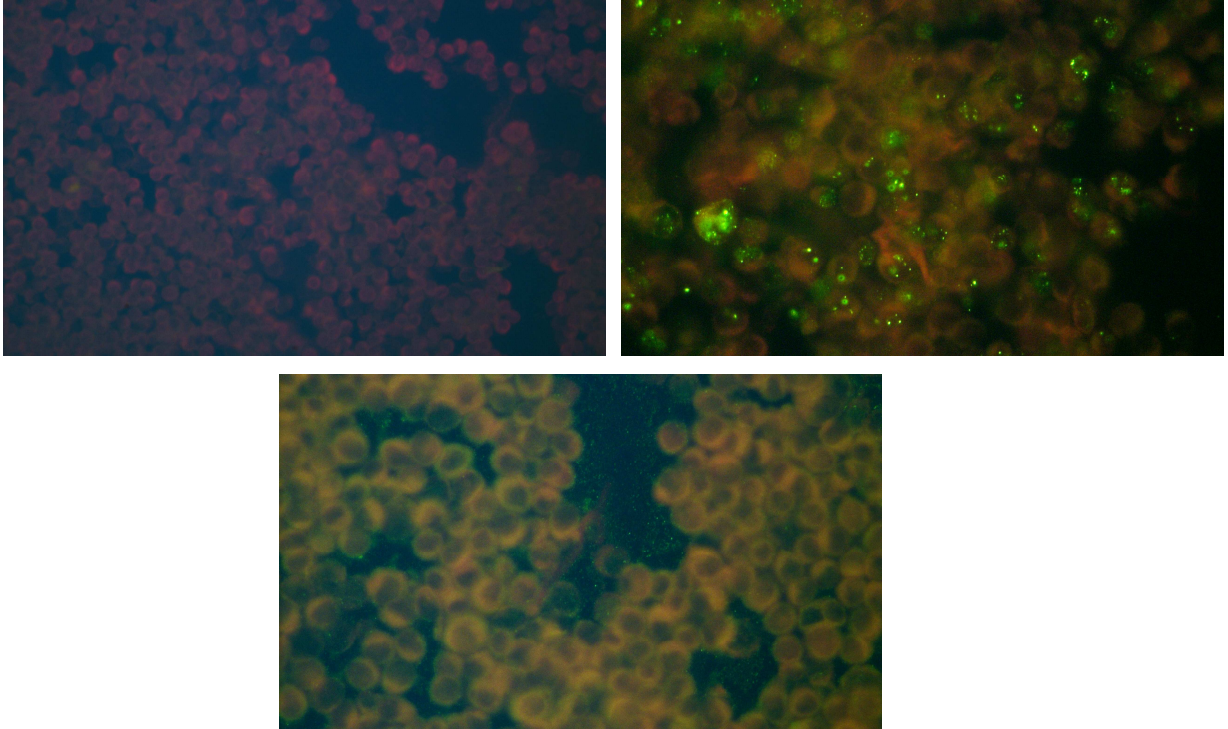
Per gli approfondimenti relativi alla tecnica dell'immunofluorescenza vedi Allegato 5



### **Il protocollo è stato il seguente:**

- ✓ Diluire il siero di cavallo 1:30 in soluzione salina fosfato (PBS, pH 7.4)
- ✓ Diluire il controllo positivo (Ab monoclonale di topo) 1:8 in soluzione salina fosfato (PBS, pH 7.4)
- ✓ Distribuire in ogni pozzetto 15 µl di siero in esame. Per ogni vetrino in esame è stato utilizzato :
  - 1 pozzetto per controllo positivo (monoclonale)
  - 1 pozzetto per controllo negativo (PBS)
  - 8 pozzetti per i sieri di cavallo
- ✓ Incubare in camera umida per 60 minuti a 37°C
- ✓ Lavare i vetrini per 5 minuti con PBS. Ripetere il lavaggio una seconda volta.
- ✓ Asciugare il liquido in eccesso.
- ✓ Preparare i sieri secondari come segue:
  - Preparare una soluzione di Blue di Evans (colorante di contrasto, Biomérieux n. cat. 75491) diluito 1:2.000 in PBS
  - Diluire il secondario antitopo IgG-FITC (Sigma Aldrich, n. cat. F0257) 1:100 nella soluzione di Blue di Evans
  - Diluire il secondario anticavallo IgG-FITC (Sigma Aldrich, n. cat. F7759) 1:200 nella soluzione di Blue di Evans
- ✓ Aggiungere 15 µl di siero secondario specifico in ogni pozzetto
- ✓ Incubazione in camera umida per 60 minuti a 37°C
- ✓ Lavare i vetrini per 5 minuti con PBS, ripetere il lavaggio una seconda volta.
- ✓ Effettuare un lavaggio veloce in acqua distillata sterile
- ✓ Asciugare il liquido in eccesso
- ✓ Aggiungere una goccia di liquido di montaggio contenente il 20% di glicerolo (Millipore, n. cat. 5096).

- ✓ Coprire il preparato con un vetrino copri oggetto e conservarlo al buio fino alla lettura.
- ✓ Lettura con microscopio a fluorescenza: le cellule infettate vengono rilevate sulla base di inclusioni di colore verde brillante localizzate a livello nucleare.



**Fig.15** In alto a sinistra si noti il controllo negativo, a destra il controllo positivo, sotto in posizione centrale un siero testato negativo.

## CAPITOLO IV: RISULTATI e DISCUSSIONE

---

Il campione da noi testato è costituito da 277 sieri di cavalli raccolti nell'ambito del Piano AIE 2009/2010. Di questi 137 provengono dalla Provincia Autonoma di Trento e 140 dalla Provincia Autonoma di Bolzano.

I sieri sono stati testati con Immunofluorescenza Indiretta per la ricerca anticorpale per virus della malattia di Borna su protocollo fornito dal Centro Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana.

Il lavoro da noi condotto rappresenta una delle più estese ricerche sierologiche attuate per Borna effettuate sul territorio del Trentino Alto Adige. Solo un precedente studio eseguito da Codazza e collaboratori (Codazza D. & Nativi D. 2005) con l'utilizzo di tre metodi di ELISA per la ricerca degli Ab dell'Ag e degli immunocomplessi ha testato una piccola quota di cavalli in tale regione (Fig.16).

Regione	Neg.	Pos.	Dubbi	Totali	Negativi	Positivi	Dubbi
Lazio	21	1	0	22	95,45%	4,55%	0,00%
Lombardia	112	82	2	196	57,14%	41,84%	1,02%
Friuli V.G.	6	13	1	20	30,00%	65,00%	5,00%
Emilia R.	63	30	1	94	67,02%	31,91%	1,06%
Sicilia	9	0	0	9	100,00%	0,00%	0,00%
Umbria	14	1	0	15	93,33%	6,67%	0,00%
Trentino A.A.	15	1	0	16	93,75%	6,25%	0,00%
Piemonte	0	1	0	1	0,00%	100,00%	0,00%
Toscana	1	1	0	2	50,00%	50,00%	0,00%
Sardegna	97	4	0	101	96,04%	3,96%	0,00%
TOTALE	338	134	4	476			

**Fig.16** Esiti delle analisi sierologiche condotte da Codazza e collaboratori in diverse regioni d'Italia tra cui il Trentino A.A. Su 16 cavalli testati uno è risultato positivo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Dei sieri testati è risultata **negativa** per la ricerca anticorpale di Borna virus con IFA la totalità del campione.

<i>Provincia</i>	<i>N°equidi testati per Borna</i>	<i>N°positivi</i>
TN	137	0
BZ	140	0
<b>Totale</b>	<b>277</b>	<b>0</b>

Il risultato ottenuto permette di escludere che la prevalenza massima ipotizzabile sia superiore al 1.04%, con un limite di confidenza del 95%.

Il nostro studio prevedeva a monte una selezione di soggetti potenzialmente più a rischio, quindi con caratteristiche tali da aumentare la probabilità di rinvenire dei soggetti positivi. Non si è trattato di eseguire un campionamento randomizzato ma di operare nel miglior scenario possibile per rinvenire qualche soggetto positivo al fine di individuare l'eventuale presenza dell'infezione. In caso di completa negatività del campione, si può escludere la presenza dell'infezione con un elevato livello di confidenza.

L'inaspettato risultato negativo ottenuto risulta in disaccordo con i dati finora riportati in letteratura non rispecchiando i valori medi del 20-40% di positività noti per equidi apparentemente sani.

In relazione a tali risultati è opportuno effettuare diverse considerazioni:

E' bene ricordare che l'immunofluorescenza Indiretta da noi usata ricerca gli anticorpi nel siero dei soggetti testati. E' noto che in corso di infezione naturale gli anticorpi sono generalmente a basso titolo e non sono presenti per tutta la durata della vita dell'animale. Periodi in cui la risposta umorale nei confronti del virus BD non è sufficiente per essere riconosciuta con le metodiche sierologiche a nostra disposizione, possono alternarsi a periodi in cui invece tale risposta viene notevolmente stimolata dall'espressione del genoma virale nell'ospite infetto. L'efficienza della replicazione virale nell'ospite è a sua volta subordinato a fattori sia genetici che fisiologici che ambientali (stress, altre patologie, concorsi sportivi etc). Nei soggetti acuti di BD, la ricerca anticorpale porta a risultati positivi nella totalità dei soggetti colpiti, mentre nei casi iperacuti non sempre la risposta immunitaria è efficiente e di conseguenza non sempre la diagnosi sierologica è positiva (Codazza D. & Nativi D. 2005; Durrwald R. & Ludwig H. 1997).

Di fatto però non sarebbe corretto assumere come certezza l'assenza di Borna Virus sul territorio del Trentino A.A. per molteplici motivazioni. In primo luogo, i soggetti del campionamento sono stati analizzati per un periodo di tempo limitato (2009-2010). Inoltre, è stato utilizzando un unico test diagnostico sierologico su soggetti non sintomatici. Il test IFA applicato permette di identificare con elevate sensibilità e specificità le immunoglobuline della classe G (IgG) nel siero dei cavalli in esame. Tuttavia, in caso di risposta immunitaria precoce, la presenza delle Ig di classe M (che sono maggiormente rappresentate in questa fase dell'infezione) non viene rivelata mediante il test da noi utilizzato. Affiancare all'effettuato screening sierologico in IFA, un protocollo diagnostico che preveda la ricerca di differenti classi di immunoglobuline (IgM ad esempio) ed eventualmente l'antigene virale potrebbero avvalorare i risultati da noi ottenuti oppure confermare la presenza di infezioni precoci ovvero ipo-reattive.

La metodica utilizzata in questo lavoro per molti autori è considerata poco sensibile e specifica se confrontata ad altre tecniche diagnostiche quali ELISA e WB. Infatti secondo questi il 30% dei campioni che risulta negativo in realtà è positivo, con quindi una sottostima della sieroprevalenza reale (Bode L. *et al* 2003; Codazza D. & Nativi D. 2005).

Sarebbe interessante concentrare le ricerche per Borna su cavalli con sintomatologia neurologica manifesta, testando i medesimi soggetti che per obbligo di legge devono essere esaminati per la *West Nile disease* e per encefaliti virali (Decreto del Ministero della Salute del 29 Novembre 2007).

Potrebbe altresì risultare utile concentrare le ricerche nei cavalli ospitati in strutture igienicamente non impeccabili, ad esempio in fattorie ove alloggiano altre specie di animali, piuttosto che in scuderie specializzate, dato che in letteratura è riportata una maggior positività tra tali soggetti (Codazza D. & Nativi D. 2005).

A tale proposito, risulta evidente che la ricerca di un'infezione virale in una specie *spill-over*, ovvero ospite occasionale del patogeno, in assenza di dati sull'effettiva prevalenza nel suo serbatoio naturale (che peraltro risulta ancora da chiarire) può portare ad una sottostima della prevalenza dell'infezione sul territorio.

Monitoraggi eseguiti nello stesso territorio, allo scopo di indagare la sieroprevalenza anche in altre specie animali, quali ad esempio la popolazione felina, e nell'uomo potrebbero permettere un confronto di tali dati con quelli ottenuti nella popolazione equina.

In conclusione bisogna anche ricordare che l'impiego della sierologia (IFA, ELISA, WB), è stata, ed è tutt'ora, al centro di controversie circa l'attendibilità dei vari test proposti, poiché i risultati ottenuti dai vari gruppi di ricerca molto spesso non sono ripetibili. La mancanza di un rete di laboratori a livello internazionale che operi in modo standardizzato ed applicando protocolli sovrapponibili nelle loro *performances*, risulta essere il principale tra gli ostacoli per la creazione di una banca dati omogenea ed attendibile, sia per i sieri animali che umani.



1. **Ackermann A., Kugel D., Schneider U., Staeheli P.** 2007a: *Enhanced polymerase activity confers replication competence of Borna disease virus in mice.* Journal of General Virology Vol.88: 3130-3132.
2. **Ackermann A., Staeheli P., Schneider U.** 2007b: *Adaptation of Borna Disease Virus to New Host Species Attributed to Altered Regulation of Viral Polymerase Activity.* Journal of Virology Vol.81, No.15: 7933-7940.
3. **Bachmann S., Caplazi P., Fischer M., Ehrensperger F., Cone R.W.** 1999: *Lack of association between Borna disease virus infection and neurological disorders among HIV-infected individuals.* Journal of Neurovirology Vol.5: 190-195.
4. **Bahmani M.K., Nowrouzian I., Nakaya T., Nakamura Y., Hagiwara K., Takahashi H., Rad M.A., Ikuta K.** 1996: *Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran.* Virus Research Vol.45: 1-13.
5. **Bajramovic J.J., Syan S., Brahic M., de la Torre J.C., Gonzalez-Dunia D.** 2002: *1- $\beta$ -D arabinofuranosylcytosine Inhibits Borna Disease Virus Replication and Spread.* Journal of Virology Vol.76, No.12: 6268-6276.
6. **Bajramovic J.J., Munter S., Syan S., Nehrbass U., Brahic M., Gonzalez-Dunia D.** 2003: *Borna Disease Virus Glycoprotein Is Required for Viral Dissemination in Neurons.* Journal of Virology Vol.77, No.22: 12222-12231.
7. **Bechter K., Herzog S., Schuttler R.** 1992: *Possible significance of Borna disease for humus.* Neurology, Psychiatry and Brain Research Vol.1:23-29.
8. **Berg A.L. & Berg M.** 1998: *A variant form of feline Borna disease.* Journal of Comparative Pathology Vol.119: 323-331.
9. **Berg M., Ehrenborg C., Blomberg J., Pipkorn R., Berg A. L.** 1998: *Two domains of the Borna disease virus p40 protein are required for interaction with the p23 protein.* Journal Genetic Virology Vol.79: 2957-2963.
10. **Berg A. L., Dorries R., Berg M.** 1999: *Borna disease virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders.* Archives of Virology Vol.144: 547-559.
11. **Berg M., Johansson M., Montell H., Berg A.L.** 2001: *Wild birds as a possible reservoir of Borna disease virus.* Epidemiol. Infect. Vol.127: 173-178.
12. **Billich C., Sauder C., Frank R., Herzog S., Bechter K., Takahashi K., Peters H., Staeheli P., Schwemmler M.** 2002: *High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins.* Biol. Psychiatry Vol.51: 979-987.
13. **Binz T., Lebelt J., Niemann H., Hagenau K.** 1994: *Sequence analysis of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep.* Virus research Vol.34: 281-289.



14. **Bilzer T., Planz O., Lipkin W. I., Stitz L.** 1995: *Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis.* Brain Pathology Vol.5: 223-230.
15. **Bilzer T. & Stitz L.** 1996: *Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system.* Critical Reviews in Immunology Vol.16: 145-222.
16. **Bode L., Riegel S., Ludwig H., Amsterdam J.D., Lange W., Koprowski H.** 1988: *Borna disease virus specific antibodies in patients with HIV infection and with mental disorder.* Lancet 2, 689.
17. **Bode L., Riegel S., Lange W., Ludwig H.** 1992: *Human Infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with chronic diseases and healthy individuals.* Journal of Medical Virology Vol.36: 309-315.
18. **Bode L., Durrwald R., Ludwig, H.** 1994b: *Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease.* Veterinary Record Vol.135: 283-284.
19. **Bode L., Zimmermann W., Ferszt R., Steinbach F., Ludwig H.** 1995: *Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients.* Nature Medicine Vol.1: 232-236.
20. **Bode L., Durrwald R., Rantam F. A., Ferszt R., Ludwig, H.** 1996: *First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders.* Molecular Psychiatry Vol.1: 200-212.
21. **Bode L., Dietrich D.E., Stoyloff R., Emrich H.M., Ludwig H.** 1997: *Amantadine and human Borna disease virus in vitro and in vivo in an infected patient with bipolar depression.* Lancet Vol.349: 178-179.
22. **Bode L. & Ludwig H.** 2000: *new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology.* Rev. Sci. Tech. Vol.19, No.1:259–88.
23. **Bode L., Reckwald P., Severus W.E., Stoyloff R., Ferszt R., Dietrich R., Ludwig H.** 2001: *Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies: the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders.* Molecular Psychiatry Vol.6:481-491.
24. **Bode L. & Ludwig H.** 2003: *Borna Disease Virus Infection, a Human Mental-Health Risk.* Clinical Microbiology Reviews Vol.16, No.3: 534-545.
25. **Bornand J.V., Fatzer R., Melzer K., Jmaa D.G., Caplazi P., Ehrensperger F.** 1998: *A case of Borna disease in a cat.* European Journal of Veterinary Pathology Vol.4: 33-35.
26. **Briese T., Hatalski C.G., Kliche S., Park Y-S., Lipkin W.I.** 1995: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies to Borna Disease Virus-Specific Proteins.* Journal of Clinical Microbiology. Vol.33, No.2: 348-351.

27. **Briese T., Hornig M., Lipkin W. I.** 1999: *Bornavirus immuno-pathogenesis in rodents: models for human neurological diseases*. Journal of Neurovirology Vol.5: 604-612.
28. **Caplazi P. & Ehrensperger F.** 1998: *Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions*. Veterinary Immunology and Immunopathology Vol.61: 203-220.
29. **Carbone K.M., Duchala C.S., Griffin J.W., Kincaid A.L., Narayan O.** 1987: *Pathogenesis of Borna Disease in Rats: Evidence that Intra-Axonal Spread Is the Major Route for Virus Dissemination and the Determinant for Disease Incubation*. Journal of Virology Vol.61, No.11: 3431-3440.
30. **Carbone K.M., Moench T.R., Lipkin W.I.** 1991: *Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats : location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization*. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology Vol.50: 205-214.
31. **Chen C.H., Chiu Y.L., Shaw C.K., Tsai M.T., Hwang A.L., Hsiao K.J.** 1999: *Detection of Borna disease virus RNA from peripheral blood cells in schizophrenic patients and mental health workers*. Molecular Psychiatry Vol.4: 566-571.
32. **Chen C.H., Chiu Y.L., Wei F.C., Koong F.J., Liu H.C., Shaw C.K., Hwu H.G., Hsiao K.J.** 1999b: *High seroprevalence of Borna virus infection in schizophrenic patients, family members and mental health workers in Taiwan*. Molecular Psychiatry Vol.4: 33-38.
33. **Castrucci G.** 2002: *Infezioni da virus degli animali domestici: Filoviridae, Bornaviridae, Astroviridae, Prioni*. Società editrice Esculapio.
34. **Codazza D. & Nativi D.** 2005: *La Borna Disease in Italia: primi rilievi epidemiologici nella specie equina circa una malattia emergente*. Tesi di dottorato di ricerca in Igiene Veterinaria e Patologia Animale dell'Università degli Studi di Milano.
35. **Cotto E., Neau D., Cransac-Neau M., Auriacombe M., Pellegrin J., Ragnaud J.J., Fillet A., Belnard M., Fleury H., Lafon M.** 2003: *Borna Disease Virus RNA in Immunocompromised Patients in Southwestern France*. Journal of Clinical Microbiology Vol.41, No.12: 5577-5581.
36. **Dauphin G., Legay V., Sailleau C., Smondack S., Hammoumi S., Zientara S.** 2001: *Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (Vulpes vulpes)*. J. Gen. Virol. Vol.82: 2199-2204.
37. **Dauphin G., Legay V., Pitel P., Zientara S.** 2002: *Borna disease: current knowledge and virus detection in France*. Veterinary Research .Vol.33: 127-138.
38. **de la Torre J.C.** 1994: *Molecular biology of Borna disease virus : prototype of a new group of animal viruses*. Journal of Virology Vol.68: 7669-7675.

39. **de la Torre J.C., Gonzalez-Dunia D., Cubitt B., Mallory M., Mueller-Lantzsch N., Grasser F.A., Hansen L.A., Masliah E.** 1996: *Detection of Borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients.* Virology Vol.223: 272-282.
40. **Dietzel J., Kuhrt H., Stahl T., Kacza J., Seeger J., Webber M., Uhlig A., Reichenbach A.** 2007: *Morphometric Analysis of the Retina from Horses Infected with the Borna Disease Virus.* Veterinary Pathology Vol.44: 57-63.
41. **Durrwald R., Ludwig H.** 1997: *Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography.* Journal of Veterinary Medicine Series B Vol.44: 147-184.
42. **Durrwald R., Kolodziejek J., Muluneh A., Herzog S., Nowotny N.** 2006: *Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations.* Microbes and Infection Vol.8: 917-929.
43. **Furrer E., Bilzer T., Stitz L., Planz O.** 2001: *Neutralizing Antibodies in Persistent Borna Disease Virus Infection: Prophylactic Effect of gp94-Specific Monoclonal Antibodies in Preventing Encephalitis.* Journal of Virology Vol.75, No.2: 943-951.
44. **Galabru J., Saron M-f., Berg M., Berg A.L., Herzog S., Labie J., Zientara S.** 2000: *Borna disease virus antibodies in French horses.* The Veterinary Record Vol.16: 721-722.
45. **Giammarioli M., La Rocca S., Steinbach F., Casciari C., De Mia G.** 2010: *Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group.* Veterinary Microbiology Vol.4950: 1-6.
46. **Gonzales-Dunia D., Watanabe M., Syan S., Mallory M., Masliah E., de la Torre J.C.** 2000: *Synaptic Pathology in Borna Disease Virus Persistent Infection.* Journal of Virology Vol.74, No.8: 3441-3448.
47. **Gonzalez-Dunia D., Volmer R., Mayer D., Schwemmler M.** 2005: *Borna disease virus interference with neuronal plasticity.* Virus Research Vol.111: 224-234.
48. **Gosztonyi G. & Ludwig H.** 1984: *Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals.* Acta Neuropathologica (Berlin) Vol.64: 213-221.
49. **Gosztonyi G. & Ludwig H.** 1995: *Borna disease neuropathology and pathogenesis.* Current Topics in Microbiology and Immunology Vol.190: 39-73.
50. **Grabner A. & Fischer A.** 1991: *Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years.* Tierärztliche Praxis Vol.19: 68-73.
51. **Hagiwara K., Kawamoto S., Takahashi H., Nakamura Y., Nakaya T., Hiramune T., Ishihara C., Ikuta K.** 1997: *High prevalence of Borna disease virus infection in healthy sheep in Japan.* Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology Vol.4: 339-344.

52. **Hagiwara K., Kamitani W., Takamura S., Taniyama H., Nakaya T., Tanaka H., Kirisawa R., Iwai H., Ikuta K.** 2000: *Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus.* Veterinary Microbiology. Vol.22: 207-216.
53. **Hagiwara K., Asakawa M., Liao L., Jiang W., Yan S., Chai J., Oku Y., Ikuta K., Ito M.** 2001: *Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China.* Veterinary Microbiology Vol.80: 383-389.
54. **Hagiwara K., Okamoto M., Kamitani W., Takamura S., Taniyama H., Tsunoda N., Tanaka H., Iwai H., Ikuta K.** 2002: *Nosological study of Borna disease virus infection in race horses.* Veterinary Microbiology Vol.84: 367-374.
55. **Hagiwara K., Tsuge Y., Asakawa M., Kabaya H., Okamoto M., Miyasho T., Taniyama H., Ishihara C., de la Torre J.C., Ikuta K.** 2008: *Borna disease virus RNA detected in Japanese macaques (Macaca fuscata).* Primates Vol.49: 57–64.
56. **Hagiwara K., Matoba Y., Asakawa M.** 2009: *Borna Disease Virus in Raccoons (Procyon lotor) in Japan.* J. Vet. Med. Sci. Vol.71, No.8: 1009-1015.
57. **Hallensleben W., Shwemmle M., Hausmann J., Stitz L., Volk B., Pagenstecher A., Staheli P.** 1998: *Borna Disease Virus-Induced Neurological Disorder in Mice: Infection of Neonates Results in Immunopathology.* Journal of Virology Vol. 72, No. 5: 4379-4386.
58. **Helps C., Turan N., Bilal T., Harbour D.A., Yilmaz H.** 2001: *Detection of antibodies to Borna disease virus in Turkish cats by using recombinant p40.* The Veterinary Record Vol.149: 647-650.
59. **Henkel M., Planz O., Fischer T., Stitz L., Rziha H.J.** 2005: *Prevention of Virus Persistence and Protection against Immunopathology after Borna Disease Virus Infection of the Brain by a Novel Orf Virus Recombinant.* Journal of Virology Vol.79, No.1: 324-325.
60. **Herden C., Herzog S., Wehner T., Zink C., Richt J.A.** 1999: *Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem.* Equine Infectious Diseases Vol.8: 286-290.
61. **Herden C., Herzog S., Richt J.A., Nessler A., Christ M., Failing K., Frese K.** 2000: *Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain.* Brain Pathology Vol.10: 39-48.
62. **Hilbe M., Herrsche R., Kolodziejek J., Nowotny N., Zlinszky K., Ehrensperger F.** 2006: *Shrews as Reservoir Hosts of Borna Disease Virus.* Emerging Infectious Diseases Vol.12, No 4: 675-677.
63. **Honkavouri K.S., Shivaprasad H.L., Williams B.L., Quan P.L., Hornig M.** 2008: *Novel Borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease.* Emerging Infectious Diseases Vol.14: 1883-1886.

64. **Horimoto T., Takahashi H., Sakaguchi M., Horikoschi K., Iritani S., Kazamatsuri H., Ikeda K., Taschiro M.** 1997: *A Reverse-Type Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies to Borna Disease Virus.* Journal of Clinical Microbiology Vol.35, No.7: 1661-1666.
65. **Inoue Y., Yamaguchi K., Sawadw T., Rivero J.C., Horii Y.** 2001: *Demonstration of continuously seropositive population against Borna disease virus in Misaki feral horses, a Japanese strain: a four-year follow-up study from 1998 to 2001.* Journal Vet. Med. Sci. Vol.64, No.5: 445-448.
66. **Iwahashi K., Watanabe M., Nakamura K., Suwaki H., Nakaya T., Nakamura, Y., Takahashi H., Ikuta K.** 1997: *Clinical investigation of the relationship between Borna disease virus (BDV) infection and schizophrenia in 67 patients in Japan.* Acta Psychiatrica Scandinavica Vol.96: 412-415.
67. **Iwata Y., Takahashi K., Peng X., Fukuda K., Ohno K., Gonda K., Mori N., Niwa S.I., Shigeta S.** 1998: *Detection and sequence analysis of Borna disease virus p24 RNA from peripheral blood mononuclear cells of patients with mood disorders or schizophrenia and of blood donors.* Journal of Virology Vol.72: 10044-10049.
68. **Jacobsen B., Algermissen D., Schaudien D., Venner M., Herzo S., Wentz E., Hewicker-Trautwein M., Baumgartner W., Herdenx C.** 2010: *Borna Disease in an Adult Alpaca Stallion ( Lama pacos ).* J. Comp. Path Vol.143: 203-208.
69. **Kamhieh S., Hodgson J., Bode L., Ludwig H., Ward C., Flower R.L.P.** 2005: *No evidence of endemic Borna disease virus infection in Australian horses in contrast with endemic infection in other continents.* Arch.Virol. Vol.151, No.4: 709-719.
70. **Kamhieh S, & Flower R.L.** 2006: *Borna disease virus (BDV) infection in cats. A concise review based on current knowledge.* Vet. Q. Vol.28, No.2: 66-73.
71. **Kao M., Hamir A.N., Rupprecht C.E., Fu Z.F., Shankar V., Koprowski H. Dietzschold B.** 1993: *Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA.* Veterinary Record Vol.132: 241-244.
72. **Katz J. B., Alstad D., Jenny A. L., Carbone K. M., Rubin S. A., Waltrip II R. W.** 1998: *Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies.* J Vet Diagn Invest Vol.10: 338-343.
73. **Kinnunen M., Billich C., Ek-Kommonen C., Henttonen H., Kallio E., Niemimaa J., Palva A., Staeheli P., Vaheri A., Vapalahti O.** 2007: *Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland.* Journal of Clinical Virology Vol.38: 64-69.
74. **Kishi M., Nakaya T., Nakamura Y., Kakinuma M., Takahashi T. A., Sekiguchi S., Uchikawa M., Tadokoro K., Ikeda, K., Ikuta K.** 1995: *Prevalence of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from blood donors.* Medical Microbiology and Immunology Vol.184: 135-138.

75. **Kistler A.L., Gancz A., Clubb S., Skewes-Cox P., Fischer K., Sorber K., Chiu C.Y., Lublin A., Mechani S., Farnoushi Y., Greninger A., Wen C.C, Karlene S.B., Ganem D., DeRisi J.L.** 2008: *Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent.* Journal of Virology Vol.5: 88.
76. **Kitani T., Kuratsune H., Fuke I., Nakamura Y., Nakaya T., Asahi S., Tobiume M., Yamaguti K., Machii T., Inagi R., Yamanishi K., Ikuta, K.** 1996: *Possible correlation between Borna disease virus infection and Japanese patients with chronic fatigue syndrome.* Microbiology and Immunology Vol.40: 459-462.
77. **Kohono T., Goto T., Takasaki T., Morita C., Nakaya T., Ikuta K., Kurane I., Sano K., Nakai M.** 1999: *Fine Structura and Morphogenesis of Borna Disease Virus.* Journal of Virology Vol.73, No.1: 760-766.
78. **Kolodziejek J, Durrwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N.** 2005: *Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin.* Journal of General Virology. Vol.86, No.2: 385-98.
79. **Lewis A.J., Whitton J.L., Hatalski C.G., Weissenbock H., Lipkin W.I.** 1999: *Effect of Immune Priming on Borna Disease.* Journal of Virology Vol.73, No.3: 2541-2546.
80. **Lieb K., Hallensleben W., Czygan M., Stitz L., Staeheli P., Bornavirus Study Group** 1997: *No Borna disease virus-specific RNA detected in blood from psychiatric patients in different regions of Germany.* Lancet Vol.350: 1002.
81. **Lundgren A.L., Czech G., Bode L., Ludwig H.** 1993: *Natural Borna disease in domestic animals other than horses and sheep.* Journal of Veterinary Medicine Series B Vol.40: 298-303.
82. **Lundgren A.L., Zimmermann W., Bode L., Czech G., Gosztanyi G., Lindberg R., Ludwig H.** 1995b: *Staggering disease in cats : isolation and characterization of the feline Borna disease virus.* Journal of General Virology Vol.76: 2215-2222.
83. **Luo M., Green T., Zhang X., Tsao J., Qiu S.** 2007: *Structural comparisons of the nucleoprotein from three negative strand RNA virus famiglie.* Virology Journal Vol 4, No.72: 1-7.
84. **Mayer D., Fischer H., Schneider U., Heimrich B., Schwemmler M.** 2005: *Borna Disease Virus Replication in Organotypic Hippocampal Slice Cultures from Rats Results in Selective Damage of Dentate Granule Cells.* Journal of Virology Vol.79, No.18:11716–11723.
85. **Morales J.A., Herzog S., Kompter C., Frese K., Rott R.** 1988: *Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats.* Medical Microbiology & Immunology Vol.177: 51-68.

86. **Nakamura Y., Kishi M., Nakaya T., Asahi S., Tanaka H., Sentsui H., Ikeda K., Ikuta K.** 1995: *Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan.* Vaccine 13: 1076-1079.
87. **Nakamura Y., Asahi S., Nakaya T., Bahamani M. K., Saitoh S., Yasui K., Mayama H., Hagiwara K., Ishihara C., Ikuta K.** 1996: *Demonstration of Borna Disease Virus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells Derived from Domestic Cats in Japan.* J. Clin. Microbiol. Vol.34 No.1: 188-191.
88. **Nakamura Y., Nakayaa T., Hagiwaraa K., Momiyamab N., Kagawab Y., Taniyamab H., Ishihara C., Sata T., Kurata T., Ikuta K.** 1998: *High susceptibility of Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) to Borna disease virus.* Vaccine Vol.17: 480-489.
89. **Nakamura Y., Watanabe M., Kamitani W., Taniyama H., Nakaya T., Nishimura Y., Tsujimoto H., Machida S., Ikuta K.** 1999: *High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan.* Veterinary Microbiology Vol.70: 153-169.
90. **Nishino Y., Funaba M., Fukushima R., Mizutani T., Kimura T., Iizuka R., Hiramami H., Hara M.** 1999: *Borna disease virus infection in domestic cats: evaluation by RNA and antibody detection.* Journal of Veterinary Medical Science Vol.61: 1167-1170.
91. **Nowotny N., Kolodziejek J., Jehle C.O., Suchy A., Staeheli P., Schwemmler M.** 2000: *Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus.* Journal of Virology Vol.74, No.12: 5655-5658.
92. **Oldach D., Zink M.C; Pyper J.M., Herzog S., Rott R., Narayan O., Clements E.** 1995: *Induction of Protection against Borna Disease by Inoculation with High-Dose-Attenuated Borna Disease Virus.* Virology Vol.206: 426-434.
93. **Patti M., Vulcano A., Candelori E., Ludwig H., Bode L.** 2008: *Borna disease virus infection in the population of Latium (Italy).* Journal Compilation APMIS Vol.116, No.124: 74-76.
94. **Patti M., Vulcano A., Candelori E., Travali S.** 2008: *Serological evidence for Borna Disease Virus infection in children, cats and horses in Sicily (Italy).* Journal Compilation APMS Vol.116, No.124: 77-79.
95. **Pisoni G., Nativi D., Bronzo V., Codazza D.** 2007: *Serological and epidemiological study of Borna disease virus infection in equine population in Italy.* Comunicazioni di Ricerca Veterinaria Vol.31, No 1: 245-248.
96. **Planz O., Bilzer T., Stitz L.** 1995: *Immunopathogenic Role of T-Cell Subsets in Borna Disease Virus-Induced Progressive Encephalitis.* Journal of Virology Vol.69, No.2: 896-903.
97. **Planz O., Rentzsch C., Batra A., Batra A., Winkler T., Buttner M., Rziha H., Stitz L.** 1999: *Pathogenesis of Borna Disease Virus: Granulocyte Fractions of Psychiatric Patients Harbor Infectious Virus in the Absence of Antiviral Antibodies.* Journal of Virology Vol.73, No.8: 6251-6256.

98. **Planz O. & Schwemmler M.** 2002: *Human Borna disease virus infection*, pg. 179-226. In: *Borna Disease Virus and Its Role in Neurobehavioral Disease* (Carbone K. ed.). ASM Press, Washington, D.C.
99. **Pleschka S., Staeheli P., Kolodziejek J., Richt J.A., Nowotny N., Schwemmler M.** 2001: *Animal: RNA Viruses Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus*. Journal Gen. Virol. Vol.82: 2681-2690.
100. **Pletnikov M.V., Rubin S.A., Schwartz G.J., Moran T.H., Sobotka T.J., Carbone K.M.** 1999: *Persistent neonatal Borna disease virus (BVD) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats*. Physiology and Behaviour. Vol.66, No.5: 823-831.
101. **Pletnikov M.V., Moran T.H., Carbone K.M.** 2002: *Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders*. Front. Biosci. Vol.7: d593-d607.
102. **Poenisch M., Wille S., Ackermann A., Staeheli P., Schneider U.** 2007: *The X Protein of Borna Disease Virus Serves Essential Functions in the Viral Multiplication Cycle*. Journal of Virology Vol.81, No.13: 7297-7299.
103. **Rackova S., Janu L., Kabickova H.** 2010: *Borna disease virus (BDV) circulating immunocomplex positivity in addicted patients in the Czech Republic: a prospective cohort analysis*. BMC Psychiatry Vol.10, No.70:1-8.
104. **Raese J. & Yahnke C.** 2004: 'Crocidura leucodon'(On-line). Animal Diversity Web. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Crocidura\\_leucodon.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Crocidura_leucodon.html).
105. **Richt J.A., Herzog S., Haberzettl K., Rott R.** 1993: *Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction*. Medical Microbiology and Immunology Vol.182: 293-304.
106. **Richt J.A., Alexander R.C., Herzog S., Hooper D.C., Kean R., Spitsin S., Bechter K., Schuttler R., Feldmann H., Heiske A., Fu Z.F., Dietzschold B., Rott R., Koprowski H.** 1997: *Failure to detect Borna disease virus infection in peripheral leucocytes from humans with psychiatric disorders*. Journal of Neurovirology Vol.3: 174-178.
107. **Richt J.A., Rott R.** 2001: *Borna disease virus: a mystery as an Emerging Zoonotic Pathogen*. The Veterinary Journal Vol.161: 24-40.
108. **Richt J.A., Grabner A., Herzog S., Garten W., Herden C.** 2007: *Borna disease in equines*. In: *Equine Infectious Diseases*. D.C. Sellon, M.T. Long, Eds., Saunders Elsevier St Louis, pp. 207-213.
109. **Rinder M., Ackermann A., Kempf H., Kaspers B., Korbel R., Staeheli P.** 2009: *Broad Tissue and Cell Tropism of Avian Bornavirus in Parrots with Proventricular Dilatation Disease*. Journal of Virology Vol.83, No.11: 5401-5401.



110. **Herzog S. & Rott R.** 1980: *Replication of Borna disease virus in cell cultures.* Medical Microbiology and Immunology Vol.168: 153-158.
111. **Rott R., Herzog S., Fleischer B., Winokur A., Amsterdam J., Dyson W., Koprowski H.** 1985: *Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders.* Science Vol.228: 755-756.
112. **Rott R. & Becht H.** 1995: *Natural and experimental Borna disease in animals.* Current Topics in Microbiology and Immunology Vol.190: 17-30.
113. **Rudolph M., Kraus I., Dickmanns A., Eickmann M., Garten W., Ficner R.** 2003: *Crystal Structure of the Borna Disease Virus Nucleoprotein.* Elsevier Science Vol. 11: 1219-1226.
114. **Salvatore M., Morzunow S., Schwemmle M., Lipkin W.I. Bornavirus Study Group** 1997: *Borna disease virus in brains of North American and European people with schizophrenia and bipolar disorder.* Lancet Vol.349: 1813-1814.
115. **Sauder C., Muller A., Cubitt B., Mayer J., Steinmetz J., Trabert W., Ziegler B., Wanke K., Mueller-Lantzsch N., de la Torre J.C., Grasser F.A.** 1996: *Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA.* Journal of Virology Vol.70: 7713-7724.
116. **Sauder C. & de la Torre J.C.** 1998: *Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology.* Journal of Virological Methods Vol.71: 229-245.
117. **Sauder C. & Staeheli P.** 2003: *Rat model of Borna Disease Virus transmission: Epidemiological implications.* Journal of Virology Vol.77, No.23: 12886-12890.
118. **Schindler A.R., Vogtlin A., Hilbe M., Puorger M., Zlinszky K., Ackermann M., Ehrensperger F.** 2007: *Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts.* Molecular and Cellular Probes Vol.21: 47-55.
119. **Schwemmle M., Jehle C., Formella S., Staeheli P.** 1999: *Sequence similarities between human bornavirus isolates and laborator strains question human origin.* Lancet Vol.354: 1973-1974.
120. **Schwemmle M., Hatalski C.G., Lewis A.J., Lipkin W.I.** 1999b: *Borna Virus.* In Persistent Viral Infections Vol: 559-573. Edited by R. Ahmed & I. Chen. Chichester : John Wiley & Sons.
121. **Sierra-Honigmann A.M., Rubin S.A., Estafanous M.G., Yolken R.H., Carbone K.M.** 1993: *Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats.* Journal of Neuroimmunology Vol.45: 31-36.

122. **Sobbe M., Bilzer T., Gommel S., Noske K., Planz O., Stitz L.** 1997: *Induction of Degenerative Brain Lesions after Adoptive Transfer of Brain Lymphocytes from Borna Disease Virus-Infected Rats: Presence of CD8+ T cells and Perforin mRNA.* Journal of Virology Vol.71, No.3: 2400-2407.
123. **Sorg I. & Metzler A.** 1995: *Detection of Borna Disease Virus RNA in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Brain Tissues by Nested PCR.* Journal Clin. Microbiol. Vol.33 No.4: 821-823.
124. **Staheli P., Sauder C., Hausmann J., Felix Ehrensperger F., Schwemmle M.** 2000: *Epidemiology of Borna disease virus.* Journal of General Virology Vol.81: 2123-2135.
125. **Stitz L., Dietzschold B., Carbone K.M.** 1995: *Immuno-pathogenesis of Borna disease.* Current Topics in Microbiology and Immunology Vol.190: 75-92.
126. **Stitz L., Noske K., Planz O., Furrer E., Lipkin I., Bilzer T.** 1998: *A Functional Role for Neutralizing Antibodies in Borna Disease: Influence on Virus Tropism outside the Central Nervous System.* Journal of Virology Vol.72, No.11: 8884-8892.
127. **Studdert M.J.** 1996: *Virus Infections of Equines.* Elsevier Amsterdam
128. **Takahashi H., Nakaya T., Nakamura Y., Asahi S., Onishi Y., Ikebuchi K., Takahashi T.A., Katoh T., Sekiguchi S., Takazawa M., Tanaka H., Ikuta K.** 1997: *Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms.* Journal of Medical Virology Vol.52: 330-335.
129. **Taieb O., Baleyte J.M., Mazet P., Fillet A.M.** 2001: *Borna Disease Virus and Psychiatry.* Eur. Psychiatry Vol.16: 3-10.
130. **Tomonaga K., Kobayashi T., Ikuta K.** 2002: *Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection.* Microbes Infect. Vol.4: 491-500.
131. **Tsujimura K., Mizutani T., Kariwa H., Yoshimatsu K., Ogino M., Morii Y., Inagaki H., Arikawa J., Takashima I.** 1999: *A serosurvey of Borna disease virus infection in wild rats by a capture ELISA.* Journal of Veterinary Medical Science Vol.61: 113-117.
132. **Vahlenkamp T.W., Enbergs H. K., Muller H.** 2000: *Experimental and natural borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of the peripheral blood.* Veterinary Microbiology Vol.76: 229-244.
133. **Vahlenkamp T.W., Konrath A., Weber M., Muller H.** 2002: *Persistence of Borna Disease Virus in Naturally Infected Sheep.* Journal of Virology Vol.76, No.19: 9735-9743.
134. **Villanueva I., Gray P., Mirhosseini N., Payne S., Hoppes S., Honkavuori K. S., Briese T., Turner D., Tizard I.** 2009: *The diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus.* Veterinary Microbiology Vol.143: 196-201.

135. **Volmer R., Bajramovic J.J., Schneider U., Ufano S., Pochet S., Gonzalez-Dunia D.** 2005: *Mechanism of the Antiviral Action of 1-Beta-D-Arabinofuranosylcytosine on Borna Disease Virus*. Journal of Virology Vol.79, No.7: 4514-4518.
136. **Walker P.M., Jordan I., Briese T., Fischer N., Lipkin W.I.** 2000: *Expression and Characterization of the Borna Disease Virus Polymerase*. Journal of Virology Vol.74, No.9: 4425-4428.
137. **Waltrip I.I., Buchanan R.W., Summerfelt A., Breier A., Carpenter W.T., Bryant N.L., Rubin S.A. Carbone K.M.** 1995: *Borna disease virus and schizophrenia*. Psychiatry Research Vol.56: 33-44.
138. **Watanabe Y., Ibrahim M., Hagiwara K., Okamoto M., Kamitani W., Yanai H., Ohtaki N., Hayashi Y., Taniyama H., Ikuta K., Tomonaga K.** 2007: *Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility*. Microbes and Infection Vol.9: 417-427.
139. **Weissenbock H., Nowotny N., Caplazi P., Kolodziejek J. Ehrensperger F.** 1998a: *Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis*. Journal of Clinical Microbiology Vol.36: 2127-2130.
140. **Weissenbock H., Suchy A., Caplazi P., Herzog S., Nowotny N.** 1998b: *Borna disease in Austrian horses*. Veterinary Record Vol.143: 21-22.
141. **Weissenbock H., Bakonyi T., Sekulin K., Ehrensperger F., Doneley R., Dürrwald R., Hoop R., Erdélyi K., Gál J., Kolodziejek J., Nowotny N.** 2009: *Avian Bornaviruses in Psittacine Birds from Europe and Australia with Proventricular Dilatation Disease*. Emerging Infectious Diseases Vol.15, No.9: 1453-1456.
142. **Wensmann JJ., Thoren P., Hakhverdyan M., Belák S., Berg M.** 2007: *Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus*. Journal of Virological Methods Vol.143: 1-10.
143. **Werner-Keiss N., Garten W., Richt J.A., Porombka D., Algermissen D.** 2008: *Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats*. Neuropathology and Applied Neurobiology Vol.34: 590-602.
144. **Wood F & Bloor M.** 2006: *Borna disease virus: The generation and review of a scientific study*. Social Science & Medicine Vol.63: 1072-1083.
145. [www.lacellula.net/appunti/immunologia/immunofluorescenza-citofluorimetria.html](http://www.lacellula.net/appunti/immunologia/immunofluorescenza-citofluorimetria.html)
146. **Yamaguchi K., Sawada T., Naraki T., Igata-Yi R., Shiraki H., Horii Y., Ishii T., Ikeda K., Asou N., Okabe H., Mochizuki M., Takahashi K., Yamada S., Kubo K., Yashiki S., Waltrip R.W., Carbone K.M.** 1999: *Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology Vol.6: 696-700.

147. **Zimmermann W., Durrwald R., Ludwig H.** 1994: *Detection of Borna disease virus RNA in naturally infected animals by a nested polymerase chain reaction.* Journal of Virological Methods Vol.46: 133-143.

Paese	% prevalenza		Campioni	Test	References
	Sogg.malati	Sogg.inapparenti			
Germania	28,6		siero	FdC	Ludwich & Thein ,1977
		12	siero	IF	Lange et al, 1987
		29	siero	IF, WB	Richt et al, 1993
		11,5	siero	IF	Herzog et al, 1994
	100	28,6	siero	IF	Vahlenkamp et al, 2000
		61,9	siero	ELISA	Dieckhofer et al, 2004
USA		8,8	siero	WB	Kao et al, 1993
		16,7	LCS	WB	
		2,7	siero	IF	
		0	LCS	IF	
		26,3	siero	WB	Nakamura et al, 1995
Giappone		16,7	siero	ELISA	Takahashi et al, 1997
		17,8	siero	ELISA	Yamaguchi et al,1999
	60,9		siero	WB	Hagiwara et al, 2002
		26,9	siero	ELISA	Inoue et al, 2002
Iran		18,1	siero	WB	Bahmani et al, 1996
Svezia	57,7	24,5	siero	ELISA	Berg et al, 1999
Bangladesh		23	siero	ELISA	Khan et al, 2000
Cina		75	siero	ELISA, WB	Hagiwara et al, 2001
Turchia		25	siero	ELISA	Yilmaz et al , 2002
Italia		26,2	siero	ELISA	Codazza et al, 2004
Lazio		4,55			
Lombardia		41,84			
Friuli V.G.		65			
Emilia R.		31,91			
Sicilia		0			
Umbria		6,67			
Trentino A.A.		<b>6,25</b>			
Piemonte		100			
Toscana		50			
Sardegna		3,96			

Tabella – sieroprevalenze per BDV in sieri umani (indagini effettuate con tecniche diverse da laboratori diversi)

Paese	Diagnosi o gruppo di soggetti testati	Numero di pazienti testati	% Siero positività	Test	References
USA	<i>Major depressive disorders</i>	265	4,5	IFA	Amsterdam <i>et al.</i> , 1985
	Volontari sani	105	0		
Germania	Vari disturbi psichiatrici	694	0,6	IFA	Rott <i>et al.</i> , 1985
	Volontari sani	95	0		
Germania	Vari disturbi psichiatrici	1.003	6,8	IFA	Bechter <i>et al.</i> , 1987
	Pazienti chirurgici	133	3,5		
Germania	HIV infetti	460	7,8	IFA	Bode <i>et al.</i> , letter, 1988
	HIV sieronegativi	125	1,6		
	HIV sieronegativi tossicodipendenti	106	3,8		
USA, Germania, Giappone	Pazienti neurologici o psichiatrici	5.000	4,7	IFA	Rott <i>et al.</i> , 1991
	Pazienti di controllo da ospedali	1.000	1		
Est Africa	Schistosomiasi e malaria	193	9,8	IFA	Bode <i>et al.</i> , 1992
Germania	Pazienti psichiatrici	2.377	5,9	IFA	Bechter <i>et al.</i> , 1992
	Pazienti chirurgici	569	3,5		
Europa	HIV positivi asintomatici	1.024	7,1	IFA, IP	Bode <i>et al.</i> , 1992
	HIV infetti	244	13,99		
	HIV sieronegativi donatori	118	2,5		
USA	<i>Major depression</i>	550	2,2	IFA, IP	Bode <i>et al.</i> , 1992
	Pazienti chirurgici	365	2,2		
Germania	Pazienti psichiatrici in fase acuta ( <i>follow-up study</i> )	71	19,7	IFA	Bode <i>et al.</i> , 1993
Germania	MS	50	0	IFA	Kitze <i>et al.</i> , 1996
Giappone	Pazienti psichiatrici	346	0,9	IFA	Kubo <i>et al.</i> , 1997
	Controlli sani	70	0		
Svizzera	HIV	16	12,5	IFA	Bachmann <i>et al.</i> , 1999
	ADC	25	8		
Germania	Pazienti psichiatrici	27	14,8	IFA	Vahlenkamp <i>et al.</i> , 2000
	Controlli sani	13	0		

Tabella – continua (II)

Paese	Diagnosi o gruppo di soggetti testati	Numero di pazienti testati	% sieropositività	Test	References
Suriname	Pazienti schizofrenici	29	3	IFA	Selten <i>et al.</i> , 2000
	Volontari sani	26	6		
USA	<i>Major depression</i>	138	6,5	IFA	Fu <i>et al.</i> , 1993
	Controlli sani	117	0,85		
USA	Pazienti schizofrenici	90	14,4	IFA	Waltrip <i>et al.</i> , 1995
	Controlli sani	20	0		
Giappone	Pazienti psichiatrici	60	30	IFA	Kishi <i>et al.</i> , 1995
Germania	Disordini psichiatrici vari	416	9,6	IFA	Sauder <i>et al.</i> , 1996
	Pazienti chirurgici	203	1,4		
Giappone	Schizofrenia	67	45,0	IFA	Iwahashi <i>et al.</i> , 1997
	Staff medico	26	0		
Taiwan	Schizofrenici	314	12,1	IFA	Chen <i>et al.</i> , 1999
	Schizofrenici asintomatici / famigliari	132	12,1		
	Donatori di sangue, altri pazienti	274	2,9		
Giappone	Pazienti psichiatrici	89	0	IFA	Tsuji <i>et al.</i> , 2000
	Volontari sani	210	0		
Thailandia	HIV sieropositivi asintomatici	60	15	ELISA	Auwanit <i>et al.</i> , 1996
	AIDS	67	17,9		
	HIV sieronegativi	103	2,5		
Giappone	Donatori di sangue	100	1	ELISA, WB	Kishi <i>et al.</i> , 1995
Giappone	Donatori di sangue viventi vicino a scuderie	428	2,6-14,8	ELISA	Takahashi <i>et al.</i> , 1997
	Donatori di sangue	100	1		
Giappone	Schizofrenia cronica	70	0	RS-ELISA	Horimoto <i>et al.</i> , 1997
	Volontari sani	40	0		

Tabella - continua (III)

Paese	Diagnosi o gruppo di soggetti testati	Numero di pazienti testati	% sieropositività	Test	References
Giappone	Schizofrenia	845	3,08	ECLIA	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999
	Mood disorders	251	3,59		
	Altri disordini psichiatrici	366	0,55		
	Malattie neurologiche	114	0		
	Malattie oculari	1.393	1,36		
	Pazienti multitrasmessi	66	4,55		
	Donatori di sangue	917	1,09		
	HIV infetti	85	1,18		
	CFS	75	0		
	Epilettici	214	1,4		
	Malattie autoimmuni	50	0		
	Lebbra	17	0		
	Polonia	Vari disturbi psichiatrici	816		
Svezia	CFS	169	0	ELISA, WB	Evengard <i>et al.</i> , 1999
	Controlli	62	0		
Giappone	Mood disorder	45	4	IFA, ECLIA, WB	Fukuda <i>et al.</i> , 2001
	Schizofrenia	45	9		

*Sieroprevalenze per BDV in sieri umani (indagini svolte in diverse nazioni, in diversi laboratori, con differenti tecniche diagnostiche tra il 1985 e il 2001) (Codazza D. & Nativi D. 2005).*



PROVINCIA	LOCALITA' AZIENDA	COORDINATE GEOGRAFICHE		ALTITUDINE	TERRITORIO	UBICAZIONE AZIENDA	NUMERO EQUIDI TESTATI PER AZIENDA	DATI CAVALLO		
		LAT NORD	LONG EST					ETA'	SESSO	RAZZA
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	13	F	Q.H.
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	10	MC	AVELIGNESE
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	10	F	AVELIGNESE
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	8	F	MTC
TN	VALSORDA	46°4'45.48"	11°7'48.72"	565	MM	C	3	16	F	PSA
								19	MC	PSA
								16	MC	PSA
TN	BONDONE	45°48'26.64"	10°33'4.68"	720	MM	C	2	15	MC	PSI
								9	M	PSI
TN	TRENTO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	2	6	MC	PAINT
								15	F	Q.H.
TN	TRENTO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	2	8	F	ARABO
								13	M	Q.H.
TN	TRENTO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	3	2	F	AVELIGNESE
								1	M	AVELIGNESE
								1	F	AVELIGNESE
TN	TERLAGO	46°5'54.24"	11°2'48.48"	456	C	C	3	17	F	Q.H.
								7	F	Q.H.
								17	F	Q.H.
TN	MARTIGNANO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	3	10	F	PSI
								6	F	PSA
								16	F	PSI
TN	BASELGA DI PINE'	46°7'40.44"	11°14'42.72"	964	MM	C	3	5	F	ANDALUSO
								14	F	MTC
								1	F	MTC
TN	BASELGA DI PINE'	46°7'40.44"	11°14'42.72"	964	MM	C	1	13	F	AVELIGNESE
TN	BASELGA DI PINE'	46°7'40.44"	11°14'42.72"	964	MM	C	1	6	F	ARGENTINO
TN	LEVICO TERME	46°0'49.68"	11°18'29.52"	506	MM	U	2	10	F	PALOMINO
								11	M	Q.H.
TN	LEVICO TERME	46°0'49.68"	11°18'29.52"	506	MM	U	4	17	MC	MTT
								25	MC	MTT
								2	MC	PONY
								2	F	PONY
TN	LEVICO TERME	46°0'49.68"	11°18'29.52"	506	MM	U	3	5	F	Q.H.
								8	F	Q.H.
								12	F	PAINT
TN	CALDONAZZO	45°59'45.24"	11°15'56.52"	480	C	C	3	9	MC	AVELIGNESE
								12	MC	ARGENTINO
								9	MC	AVELIGNESE
TN	CALDONAZZO	45°59'45.24"	11°15'56.52"	480	C	C	1	16	F	Q.H.

TN	CALDONAZZO	45°59'45.24"	11°15'56.52"	480	C	C	4	9	F	PAINT
								12	F	Q.H.
								16	F	MTC
								9	MC	PONY
TN	MOENA	46°22'41.52"	11°39'43.56"	1184	M	C	1	24	F	Q.H.
TN	PIEVE DI TESINO	46°4'8.76"	11°36'40.68"	843	MM	C	2	10	F	NORICO
								1	F	NORICO
TN	CAVEDINE	45°59'45.96"	10°58'28.56"	504	MM	C	1	4	F	AVELIGNESE
TN	TORCEGNO	46°4'30.72"	11°27'2.88"	769	MM	U	3	20	F	PAINT
								6	F	CRIOLLO
								4	M	CRIOLLO
TN	GRIGNO	46°1'0.84"	11°38'16.44"	263	P	C	2	12	F	ANDALUSO
								6	F	SELLA ITA
TN	CASTEL TESINO	46°3'51.84"	11°38'0.24"	871	MM	C	3	18	F	AVELIGNESE
								6	F	AVELIGNESE
								4	MC	MTC
TN	RONZO CHIENIS	45°53'25.80"	10°57'3.96"	974	MM	C	4	6	F	Q.H.
								8	F	Q.H.
								12	M	PAINT
								21	F	PAINT
TN	CEMBRA	46°10'28.56"	11°13'18.48"	667	MM	C	3	13	F	MTC
								10	F	ARGENTINO
								10	M	PAINT
TN	ARCO	45°55'14.88"	10°53'8.88"	91	P	U	1	9	MC	APPALOOSA
TN	CAVALESE	46°17'32.64"	11°27'37.44"	1000	M	C	1	5	F	Q.H.
TN	CAVALESE	46°17'32.64"	11°27'37.44"	1000	M	C	1	2	F	MTC
TN	VILLA RENDENA	46°3'45.36"1	10°42'43.56"	608	MM	C	1	10	F	AVELIGNESE
TN	TRES	46°19'26.40"	11°5'52.44"	810	MM	C	1	5	MC	Q.H.
TN	TRES	46°19'26.40"	11°5'52.44"	810	MM	C	1	3	F	Q.H.
TN	SPORMINORE	46°14'15.72"	11°1'52.68"	515	MM	C	1	3	F	AVELIGNESE
TN	SARNONICO	46°25'13.08"	11°8'34.08"	963	MM	U	1	5	F	PSA
TN	MORI	45°51'4.68"	10°58'54.12"	204	P	U	1	4	F	AVELIGNESE
TN	CENTA SAN NICOLO'	45°58'12.72"	11°14'0.24"	830	MM	C	1	6	F	Q.H.
TN	CIVEZZANO	46°5'32.64"	11°11'0.24"	469	C	C	1	4	F	Q.H.
TN	TERZOLAS	46°3'18.36"	11°31'45.84"	356	C	C	2	6	F	PSA
								18	F	PSA
TN	TON	46°15'58.32"	11°5'20.40"	482	C	C	2	11	F	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
TN	VILLA AGNEO	46°3'18.36"	11°31'45.84"	356	C	C	2	19	F	ARGENTINO
								1	F	PAINT
TN	TRANSACQUA	46°10'21.36"	11°49'54.12"	746	MM	C	3	10	F	ARABO
								6	F	ARABO
								8	F	AVELIGNESE
TN	ZIANO DI FIEMME	46°17'14.64"	11°34'1.20"	953	MM	C	1	2	MC	TPR

TN	COREDO	46°21'6.12"	11°5'23.28"	831	MM	C	2	17	F	Q.H.
								11	F	Q.H.
TN	COREDO	46°21'6.12"	11°5'23.28"	831	MM	C	4	22	MC	AVELIGNESE
								18	F	PAINT
								5	MC	AVELIGNESE
								4	F	AVELIGNESE
TN	POZZA DI FASSA	46°25'10.20"	11°40'27.84"	1382	M	C	1	4	F	Q.H.
TN	STORO	45°51'3.24"	10°34'37.92"	409	C	C	1	5	F	MERENS
TN	VARENA	46°18'27.36"	11°27'33.48"	1180	M	C	1	10	F	AVELIGNESE
TN	AMBLAR	46°23'46.68"	11°8'52.08"	980	MM	C	4	4	M	AVELIGNESE
								7	MC	AVELIGNESE
								20	MC	BARDIGIANO
								18	MC	AVELIGNESE
TN	SOPRAMONTE	46°4'45.48"	11°7'48.72"	623	MM	U	3	21	MC	ARABO
								14	F	SELLA ITA
									F	ARABO
TN	TELVE	46°4'19.92"	11°28'50.16"	550	MM	C	4	13	F	FRISONE
								7	F	AVELIGNESE
								8	F	AVELIGNESE
								4	F	MTC
TN	DAIANO	46°18'9.00"	11°27'0.36"	1160	M	C	2	7	F	Q.H.
								11	MC	PAINT
TN	ROVERETO	45°53'25.80"	11°2'22.92"	204	P	U	2	21	MC	Q.H.
								14	MC	ARABO
TN	DIMARO	46°19'37.56"	10°52'18.48"	766	MM	C	4	2	F	Q.H.
								13	F	Q.H.
								9	F	PAINT
								5	F	PAINT
TN	RABBI	46°24'4.32"	10°50'48.12"	1095	M	C	1	12	F	T.P.R.
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	2	11	F	Q.H.
								20	F	Q.H.
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	1	17	F	ARABO
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	1	5	F	Q.H.
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	2	17	F	AVELIGNESE
								9	F	AVELIGNESE
TN	MALE'	46°21'9.00"	10°54'50.04"	738	MM	U	1	7	F	PAINT
TN	RONCHI	46°4'9.48"	11°26'10.32"	776	MM	C	1	10	M	Q.H.
TN	SPERA	46°4'16.32"	11°30'36.00"	553	MM	C	1	20	F	Q.H.
TN	SPERA	46°4'16.32"	11°30'36.00"	553	MM	C	1	14	F	MTC
TN	CAVIZZANA	46°22'5.16"	10°57'33.12"	710	MM	C	3	5	F	PSA
								2	F	ARABO
								11	MC	ARABO
TN	TESERO	46°17'28.68"	11°30'46.80"	1000	M	C	1	2	M	NORICO

TN	TESERO	46°17'28.68"	11°30'46.80"	1000	M	C	4	3	MC	Q.H.
								2	M	Q.H.
								7	F	Q.H.
								3	MC	AVELIGNESE
TN	TESERO	46°17'28.68"	11°30'46.80"	1000	M	C	4	3	MC	MTC
								7	F	MTC
								5	F	AVELIGNESE
								14	F	AVELIGNESE
TN	CLES	46°21'57.60"	11°2'2.40"	658	MM	C	2	1	F	Q.H.
								6	MC	ARGENTINO
totale soggetti campionati nella provincia di Trento							<b>137</b>			

Allegato 3 sezione BZ

PROVINCIA	LOCALITA' AZIENDA	COORDINATE GEOGRAFICHE		ALTITUDINE	TERRITORIO	UBICAZIONE AZIENDA	NUMERO EQUIDI TESTATI PER AZIENDA	DATI CAVALLO		
		LAT NORD	LONG EST					ETA'	SESSO	RAZZA
BZ	APPIANO	46°27'20.16"	11°15'46.08"	416	C	C	2	10	F	AVELIGNESE
								10	F	AVELIGNESE
BZ	APPIANO	46°27'20.16"	11°15'46.08"	416	C	C	3	9	F	MERENS
								17	F	MERENS
								17	MC	AVELIGNESE
BZ	SLUDERNO	46°39'55.44"	10°35'9.60"	921	MM	C	1	3	M	Q.H.
BZ	MALLES VENOSTA	46°41'19.68"	10°32'51.36"	1051	M	C	1	2	M	AVELIGNESE
BZ	S. MARTINO IN BADIA	46°40'56.64"	11°53'56.76"	1135	M	C	1	3	M	AVELIGNESE
BZ	ANTERIVO	46°16'45.84"	11°22'2.28"	1209	M	C	1	10	F	AVELIGNESE
BZ	PARCINES	46°41'6.36"	11°4'27.84"	626	MM	C	1	8	F	AVELIGNESE
BZ	S. LEONARDO IN PASSIRIA	46°48'49.32"	11°14'48.48"	689	MM	C	1	4	M	AVELIGNESE
BZ	S. LEONARDO IN PASSIRIA	46°48'49.32"	11°14'48.48"	689	MM	C	4	10	F	AVELIGNESE
								5	F	AVELIGNESE
								19	F	AVELIGNESE
								18	F	ARABO
BZ	S. MARTINO IN PASSIRIA	46°47'5.28"	11°13'41.88"	597	MM	C	1	9	F	AVELIGNESE
BZ	VAL DI VIZZE	46°54'3.24"	11°27'57.96"	948	MM	C	3	2	MC	AVELIGNESE
								10	MC	AVELIGNESE
								6	MC	AVELIGNESE
BZ	SENALES	46°42'24.84"	10°54'34.20"	1327	M	C	1	4	F	AVELIGNESE
BZ	SENALES	46°42'24.84"	10°54'34.20"	1327	M	C	1	3	F	AVELIGNESE
BZ	LUSON	46°44'49.56"	11°45'43.20"	972	MM	C	1	5	F	AVELIGNESE
BZ	VIPITENO	46°53'36.24"	11°25'51.96"	948	MM	U	4	2	M	AVELIGNESE
								2	M	AVELIGNESE
								2	M	AVELIGNESE
								3	M	AVELIGNESE
BZ	VELTURNO	46°40'6.24"	11°35'45.96"	851	MM	C	1	4	F	PSA
BZ	BRENNERO	46°56'20.40"	11°26'36.60"	1098	M	U	1	2	M	PAINT
BZ	DOBBIACO	46°43'32.88"	12°13'19.56"	1256	M	U	1	26	F	MTC
BZ	DOBBIACO	46°43'32.88"	12°13'19.56"	1256	M	U	1	4	MC	ARABO
BZ	BRAIES	46°43'15.96"	12°8'3.84"	1213	M	C	1	11	F	AVELIGNESE
BZ	ANTERSELVA	46°46'45.84"	12°2'53.88"	1030	M	C	4	25	F	MTC
								11	F	AVELIGNESE
								8	M	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
BZ	ANTERSELVA	46°46'45.84"	12°2'53.88"	1030	M	C	2	7	MC	BARDIGIANO
								3	MC	AVELIGNESE
BZ	VERANO	45°41'22.56"	9°13'32.16"	264	P	C	2	4	F	AVELIGNESE
								5	F	AVELIGNESE

BZ	PRATO ALLO STELVIO	46°37'11.64"	10°35'32.64"	915	MM	C	2	25	F	ARGENTINO
								7	F	ARGENTINO
BZ	S.PANCRAZIO	46°35'9.96"	11°5'13.92"	735	MM	C	4	2	F	AVELIGNESE
								6	MC	AVELIGNESE
								9	MC	AVELIGNESE
								3	M	AVELIGNESE
BZ	S.PANCRAZIO	46°35'9.96"	11°5'13.92"	735	MM	C	2	8	F	AVELIGNESE
								11	F	AVELIGNESE
BZ	ULTIMO	46°32'57.12"	11°0'18.72"	1190	M	C	1	11	M	AVELIGNESE
BZ	SAN CANDIDO	46°44'2.04"	12°16'47.64"	1175	M	C	1	2	F	AVELIGNESE
BZ	FIE'	46°31'3.36"	11°30'8.28"	880	MM	C	1	8	F	AVELIGNESE
BZ	FIE'	46°31'3.36"	11°30'8.28"	880	MM	C	1	14	F	Q.H.
BZ	CASTELROTTO	46°34'3.00"	11°33'43.20"	1060	M	C	3	16	F	ARABO
								3	F	AVELIGNESE
								11	F	ARABO
BZ	CASTELROTTO	46°34'3.00"	11°33'43.20"	1060	M	C	1	4	M	AVELIGNESE
BZ	CASTELROTTO	46°34'3.00"	11°33'43.20"	1060	M	U	3	1	F	AVELIGNESE
								16	F	AVELIGNESE
								9	F	AVELIGNESE
BZ	CALDARO	46°24'50.76"	11°14'31.92"	425	C	C	1	6	M	MTC
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	2	5	F	SELLA ITA
								4	F	SELLA ITA
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	1	14	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	2	16	MC	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	1	10	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	2	7	F	AVELIGNESE
								8	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	3	3	F	QH
								5	F	AVELIGNESE
								6	F	AVELIGNESE
BZ	LANA	46°28'57.00"	11°57'18.00"	1475	M	U	1	3	F	AVELIGNESE
BZ	LANA	46°28'57.00"	11°57'18.00"	1475	M	C	1	15	M	FRISONE
BZ	VILLANDRO	46°37'54.12"	11°32'17.16"	880	MM	C	4	10	F	AVELIGNESE
								8	F	MTC
								5	M	AVELIGNESE
								14	F	AVELIGNESE
BZ	MERANO	46°40'8.40"	11°9'44.28"	325	C	U	1	7	M	PSI
BZ	MERANO	46°40'8.40"	11°9'44.28"	325	C	U	1	15	MC	PSI
BZ	SILANDRO	46°37'45.48"	10°46'19.92"	721	MM	C	1	8	F	AVELIGNESE
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	1	6	M	AVELIGNESE

BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	4	14	F	AVELIGNESE
								2	M	AVELIGNESE
								13	F	AVELIGNESE
								8	F	PAINT
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	1	19	F	TPR
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	3	6	F	AVELIGNESE
								17	F	AVELIGNESE
								3	MC	AVELIGNESE
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	1	3	F	AVELIGNESE
BZ	MOSO IN PASSIRIA	46°49'58.80"	11°10'3.00"	1007	M	C	1	3	F	MTC
BZ	BRESSANONE	46°42'35.28"	11°39'26.64"	559	MM	C	1	17	F	AVELIGNESE
BZ	BRESSANONE	46°42'35.28"	11°39'26.64"	559	MM	U	4	5	M	SELLA ITA
								4	M	SELLA ITA
								3	F	HANNOVER
								3	F	ANDALUSO
BZ	CHIUUSA	46°38'36.24"	11°34'22.80"	523	MM	C	4	4	F	AVELIGNESE
								10	F	AVELIGNESE
								11	M	AVELIGNESE
								6	F	AVELIGNESE
BZ	VALLE AURINA	46°59'49.56"	11°58'51.24"	1054	M	C	1	12	M	AVELIGNESE
BZ	CAMPO TURES	46°55'16.32"	11°57'19.80"	864	MM	C	1	6	F	AVELIGNESE
BZ	SELVA DEI MULINI	46°53'30.48"	11°51'40.32"	1229	M	C	2	17	F	AVELIGNESE
								11	M	AVELIGNESE
BZ	BOLZANO	46°29'36.96"	11°20'4.56"	262	P	U	2	3	M	PSA
								3	F	PSA
BZ	BADIA	46°36'39.60"	1°53'40.20"	1315	M	C	2	12	F	AVELIGNESE
								15	F	MTC
BZ	BADIA	46°36'39.60"	1°53'40.20"	1315	M	C	1	18	F	AVELIGNESE
BZ	NATURNO	46°38'58.56"	11°0'21.96"	528	MM	C	2	21	F	TPR
								4	F	NORICO
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	1	5	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	2	6	F	AVELIGNESE
								12	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	2	8	F	AVELIGNESE
								7	F	Q.H.
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	1	14	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	4	12	F	MTC
								5	F	AVELIGNESE
								11	F	AVELIGNESE
								4	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	1	7	M	PSI
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	2	4	M	ARGENTINO
								4	M	ARGENTINO

BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	2	2	M	CRIOLLO
								10	F	PAINT
BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	3	10	F	AVELIGNESE
								5	M	AVELIGNESE
								3	F	AVELIGNESE
BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	2	10	F	AVELIGNESE
								10	F	AVELIGNESE
BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	1	16	F	AVELIGNESE
BZ	SESTO	46°42'11.88"	12°21'3.60"	1310	M	C	4	10	M	AVELIGNESE
								5	M	AVELIGNESE
								11	F	AVELIGNESE
								7	M	AVELIGNESE
BZ	FUNES	46°38'37.32"	11°40'45.48"	1132	M	C	1	13	F	AVELIGNESE
BZ	FUNES	46°38'37.32"	11°40'45.48"	1132	M	C	2	2	F	MTC
								6	M	AVELIGNESE
BZ	MAREBBE	46°41'57.48"	11°56'9.96"	1285	M	C	2	13	F	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
totale soggetti campionati nella provincia di Bolzano							140			

**Legenda :**

P: Pianura

C: Collina

MM: Mezza Montagna

M: Montagna

U: zona Urbana

C: zona di Campagna

**Dati cavalli**

M: Maschio stallone

MC: Maschi castrati

F: Femmine

**Razza:**

MTC: Metticci

Psi: Purosangue Inglese

Psa: Purosangue Arabo

Q.H.: Quarter Horse

TPR: Tiro Pesante Rapido



Centro di Referenza per le Malattie degli Equini (CERME)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – ROMA

**Scheda anagrafica e di accompagnamento campioni  
ricerca degli anticorpi per il Virus di BORNA  
(da allegare alla scheda per l'Anemia Infettiva Equina - AIE)**

Numero del verbale di prelievo \_\_\_\_\_

Numero di registrazione della scheda AIE di riferimento (per il laboratorio)

\_\_\_\_\_

**ATTRIBUTI DELLA AZIENDA SEDE DI PRELIEVO**

**Coordinate geografiche** (Sistema WGS84, gradi decimali): **Lat. Nord** \_\_\_\_\_

**Long. Est** \_\_\_\_\_

**Altitudine sul livello del mare** (altimetria) mt. \_\_\_\_\_ aslm

**Ubicazione\***  Pianura  Collina (300-500 mt)  Mezza montagna (500 – 1000mt)   
Montagna (>1000 mt)

*\*indicativa, se è assente precisa altimetria*

**Gli equidi sono detenuti all'aperto in**  paddock esterni  recinto all'aperto  pascolo

**Ubicazione azienda**  zona urbana  campagna

**Numero di equidi sottoposti a prelievo N** \_\_\_\_\_

**Progressivi relativi alla scheda AIE dei cavalli sottoposti a prelievo anche per virus BORNA (max 4 equidi per azienda)**

Campione progr. N° \_\_\_\_\_

Campione progr. N° \_\_\_\_\_

Campione progr. N° \_\_\_\_\_

Campione progr. N° \_\_\_\_\_

**Indicare chiaramente nella scheda AIE l'anno di nascita dei cavalli sottoposti a prelievo per BORNA**

## IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza è una delle tecniche più usate tra le reazioni sierologiche, di fondamentale importanza in microbiologia, immunologia, o comunque nel laboratorio biomedico, per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni od anticorpi ignoti la cui controparte nota (quella a disposizione del ricercatore o laboratorista) è variamente legata ad un marcatore. Il marcatore è un fluorocromo, ovvero un colorante che assorbendo onde ad alta frequenza (ultravioletti) emette nel visibile. Il fluorocromo più impiegato è l'isotiocianato di fluorescina (o semplicemente fluorescina) che assorbendo raggi ultravioletti, con l'ausilio di un microscopio illuminato da una fonte adatta, emette luce verde. Esistono due principali metodiche che utilizzano il principio dell'immunofluorescenza, quella diretta e quella indiretta.

- IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA

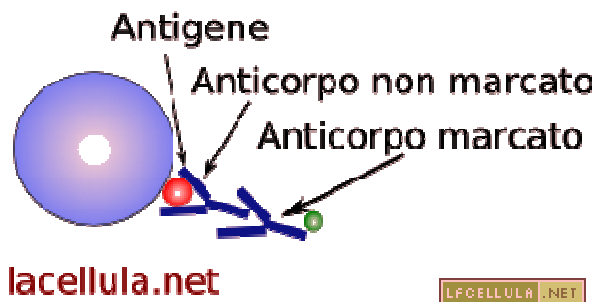
Quando si cerca un antigene corpuscolato ignoto (batterio, cellula, ...), si fissa con apposite metodiche l'antigene al vetrino (o pozzetto), poi si mettono a contatto i presunti anticorpi specifici marcati con fluorescina (eventualmente usando diversi anticorpi in ricerche successive). Si lascia a contatto per il tempo necessario all'interazione antigene-anticorpo, poi si lava accuratamente. In questo modo gli anticorpi fluorescenti non legati vengono eliminati. Se al microscopio si visualizzano corpuscoli fluorescenti (verdi brillanti), su sfondo scuro, significa che nel campione in esame era presente l'antigene e che esso è stato identificato mediante la reazione Ag-Ab utilizzando un antisiero specifico coniugato con fluoresceina. Tale tecnica non permette però di ricercare anticorpi specifici in un siero prelevato da un soggetto. A tal fine si utilizza l'immunofluorescenza indiretta.

- IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Viene usata per ricercare un antigene od un anticorpo ignoto.

Per la ricerca dell'antigene ignoto (Ag?), dopo averlo fissato con opportune metodiche al pozzetto, si mette a contatto con un antisiero specifico (conosciuto) non marcato (Ab I); si formerà l'eventuale immunocomplesso primario. Con dei lavaggi si portano via tutti gli anticorpi che non si sono legati. Si aggiunge poi un altro antisiero anti-immunoglobuline

specifico nei confronti delle specie di origine del siero primario, marcato con fluorescina (ovvero anticorpi anti-anticorpi Ab Ig II\*); se nel preparato sono rimasti anticorpi dopo il primo lavaggio, avremo la formazione di un immunocomplesso secondario (cioè gli Ab Ig II\* si legheranno agli Ab I che si erano legati all'Ag). Si effettua un secondo lavaggio. Se si osserva il preparato all'ultravioletto e si noterà la fluorescenza significa che l'antigene presente nel materiale in esame è quello per l'anticorpo specifico Ab I.



**Fig.15** Nell'IFA un anticorpo non marcato si lega all'antigene formando il complesso antigene-anticorpo. A questo complesso, e più precisamente nel frammento FC, si lega a sua volta un anticorpo marcato con la fluorescina o con la rodamina. Questo sistema è definito anticorpo anti-anticorpo per indicare che l'immunoglobulina non reagisce contro l'antigene bensì contro un'altra immunoglobulina che l'ha riconosciuto ([www.lacellula.net](http://www.lacellula.net)).

Nella ricerca **dell'anticorpo ignoto** (Ab?), si mette il siero in esame a contatto con antigeni noti (Ag) fissati ad un vetrino, in questo modo si formerà l'eventuale immunocomplesso primario. Dopo un accurato lavaggio, si aggiunge un antisiero anti-immunoglobuline, della specie da cui proviene il siero in esame, marcato con fluorescina (Ab Ig II\*); se nel preparato sono rimasti anticorpi dopo il primo lavaggio, avremo la formazione di un immunocomplesso secondario (cioè gli Ab Ig II\* si legheranno agli Ab? che si erano legati all'Ag noto). Si effettua un secondo lavaggio e si osserva il preparato all'ultravioletto: se si nota la fluorescenza significa che l'anticorpo ricercato è specifico per l'antigene a noi noto ([www.lacellula.net](http://www.lacellula.net)).

## IL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Dopo aver preparato il substrato formato dal complesso antigene-anticorpo marcato attraverso il microscopio a fluorescenza è possibile osservare la sua localizzazione. Il funzionamento del microscopio a fluorescenza è molto intuitivo in quanto, in una prima fase, emette un fascio di luce infrarossa (<750nm) che colpisce il preparato. La caratteristica del marcatore fluorescente è che assorbe la luce e, grazie a reazioni di ossidoriduzione, la restituisce con un livello energetico superiore. Secondo l'equazione d'onda della luce all'aumentare dell'energia diminuisce la lunghezza d'onda per cui dai

750nm dell'infrarosso il complesso riemette luce con lunghezza d'onda pari a circa 700nm (luce rossa) o 530nm(luce verde) .

I vantaggi dell'immunofluorescenza indiretta sono:

- ✓ la sua semplicità e rapidità di esecuzione.
- ✓ la sua buona sensibilità che permette di individuare rapidamente i campioni negativi (che in genere sono la maggioranza).
- ✓ la grande economicità di gestione, pur considerando l'ammortamento delle apparecchiature richieste.

Gli svantaggi dell'immunofluorescenza indiretta sono:

- ✓ la necessità di personale tecnico esperto per la preparazione dei substrati e di una dotazione di apparecchiature abbastanza costose (criostato, congelatore a  $-70^{\circ}\text{C}$  e microscopio a fluorescenza).
- ✓ un certo grado di soggettività dell'operatore al microscopio che determina il risultato positivo/negativo.
- ✓ l'essere un metodo semi-quantitativo.
- ✓ la relativa difficoltà a reperire certi substrati.