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

L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
principali risultati e loro trasferibilità operativa

Messa a punto di saggi per la diagnosi in vita di Cimurro e caratterizzazione dei ceppi circolanti in Italia centrale

N. identificativo progetto:
IZS LT 13/15 RC

Responsabile scientifico del progetto: Maria Teresa Scicluna

Elenco delle UU.OO. impegnate nel progetto:
1) Maria Teresa Scicluna – DO Diagnosi delle Malattie Virali e delle Leptospirosi
2) Ida Ricci – DO Diagnosi delle Malattie Virali e delle Leptospirosi
3) Antonella Cersini - Ufficio di Staff Biotecnologie
4) Goffredo Grifoni - Ufficio di Staff Accettazione, Refertazione e Sportello dell'Utente

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

Introduzione (1)

- **Il virus del Cimurro** (CDV) rappresenta una delle principali cause di patologie sistemiche virali, anche ad esito letale, nei **carnivori domestici e selvatici** (principalmente canidi e mustelidi), ma anche in numerose altre **specie selvatiche**.

- Attualmente la diagnosi nell'animale in vita viene effettuata principalmente mediante **test sierologici**, che sono di **difficile interpretazione diagnostica**, soprattutto in soggetti vaccinati ed in aree con infezione endemica. Inoltre, attualmente l'**attività diagnostica diretta** presso il nostro Istituto è esclusivamente ***post mortem***.

Introduzione (2)

- In bibliografia sono disponibili alcuni metodi di tipo PCR per la ricerca di CDV e sono state descritte alcune matrici, con alti titoli virali, quali urine e tamponi rettali, che potrebbero essere impiegate per la diagnosi diretta di Cimurro nell'animale in vita, ma si tratta di esperienze condotte su un numero limitato di soggetti.

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

Obiettivi

1) Individuare metodi diagnostici rapidi e sensibili e selezionare le matrici più idonee da prelevare per la diagnosi di Cimurro negli animali in vita, per migliorare l'efficacia del sistema diagnostico e offrire servizi più rispondenti alle esigenze dei veterinari.

2) Effettuare la caratterizzazione genetica degli stipiti virali circolanti di CDV nelle Regioni Lazio e Toscana per approfondire l'epidemiologia dell'infezione.

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

Materiali e metodi (1)

- Realizzazione brochure informativa
- Redazione scheda invio campioni
- Definizione del set di matrici da prelevare
- Raccolta dei campioni
- Test di immunofluorescenza (IF) per la ricerca diretta dell'antigene del CDV da organi
- Test di tipo PCR su organi e tamponi
- Confronto dei risultati ottenuti con i due test
- Analisi filogenetica dei ceppi CDV circolanti individuati
- Esami istologici ed immunoistochimici su organi

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

Materiali e metodi (2)

Test molecolari di tipo PCR

- Sono stati selezionati tre protocolli presenti in bibliografia (Scagliarini et al., 2007; Elia et al., 2006; Wilkes et al., 2014).
- Sono state valutate la sensibilità e la specificità dei differenti protocolli individuati sia con la costruzione di standard specifici che con differenti matrici raccolte durante il progetto.

Analisi filogenetica dei ceppi CDV circolanti

Per lo studio filogenetico dei ceppi CDV circolanti, dopo aver effettuato un'attenta ricerca bibliografica è stato selezionato il seguente protocollo:

- Detection of morbillivirus infection by RT-PCR RFLP analysis in cetaceans and carnivores, Verna et al., (2017).

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

Materiali e metodi (3)

Esami istologici ed immunoistochimici

- L'esame istologico è stato effettuato inizialmente solo sull'**encefalo** e sul **polmone** dei soggetti campionati durante l'esame anatomopatologico; **in caso di positività** alle prove virologiche, si è proceduto all'esame istologico **anche** su tutti gli altri organi (**fegato, milza, pancreas, rene, vescica, stomaco, linfonodi meseraici ed intestino**) prelevati precedentemente e conservati in formalina.

- Allo scopo di valutare la presenza diretta dell'antigene virale nei tessuti, è stata allestita una **metodica immunoistochimica** su **tutti gli organi** provenienti dai **soggetti positivi.**

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

Risultati (1)

Campioni esaminati e positivi rilevati

ANNO/SPECIE	N° soggetti	N° positivi
2017	**24**	**6**
CANE	2	1
LUPO	6	0
TASSO	4	0
VOLPE	12	5
2018	**56**	**5**
CANE	16	0
FURETTO	1	0
LUPO	10	2
MANGUSTA	1	0
MARMOTTA	1	0
VOLPE	27	3
2019	**42**	**1**
CANE	6	1
ISTRICE	1	0
LUPO	6	0
MARTORA	1	0
PROCIONE	6	0
TASSO	1	0
VOLPE	21	0
N° Totale	**122**	**12**

Da marzo 2017 a ottobre 2019 sono stati esaminati 122 soggetti appartenenti a cani deceduti con manifestazione di sintomi e/o lesioni ascrivibili al Cimurro ed altri soggetti di specie selvatiche suscettibili rinvenuti morti o abbattuti. Di questi 12 sono risultati positivi.

SPECIE/PROVINCIA	N° POSITIVI
VOLPE	**8**
AREZZO	4
ROMA	3
RIETI	1
CANE	**2**
RIETI	1
ROMA	1
LUPO	**2**
AREZZO	1
RIETI	1
N° totale	**12**

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

Risultati (2)

Esiti diagnostici

	NEGATIVI PCR			POSITIVI PCR		
MATRICI	**NEG IF**	**POS IF**	**Non eseguibile**	**NEG IF**	**POS IF**	**Non eseguibile**
COAGULO INTRACARDIACO	/	/	43	/	/	3
ENCEFALO	99	1	4	2	4	/
POLMONE	104	1	5	3	4	/
TAMPONE CONGIUNTIVALE	/	/	88	/	/	8
TAMPONE NASALE	/	/	87	/	/	8
TAMPONE RETTALE	/	/	82	/	/	9
TAMPONE VESCICALE	/	/	45	/	/	3
URINE	/	/	30	/	/	2
Totale	**203**	**2**	**384**	**5**	**8**	**33**

- 2 campioni positivi in IF sono risultati negativi in PCR probabilmente per la degenerazione dell'acido nucleico virale;
- la PCR ha permesso di rilevare ulteriori 5 campioni positivi oltre quelli rilevati soltanto con l'IF.

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

Risultati (3)

Esiti ottenuti con la Real time PCR per le diverse matrici

COAGULO INTRACARDIACO	ENCEFALO	POLMONE	TAMPONE CONGIUNTIVALE	TAMPONE NASALE	TAMPONE RETTALE	TAMPONE VESCICALE/URINE
-	-	-	+	+	+	+
n.p.	+	-	-	+	+	n.p.
-	-	+	-	-	-	n.p.
n.p.	+	+	+	+	+	+
n.p.	-	+	+	+	+	+
n.p.	n.p.	-	+	-	+	n.p.
+	+	+	+	+	+	+
-	+	-	-	-	-	-
-	-	-	+	+	-	-
n.p.	-	+	-	-	+	-
n.p.	+	+	+	+	+	+

+: positivo; -: negativo; n.p.: non pervenuto

Matrice	N° pos/ N° tot	%
Encefalo	5/10*	50
Polmone	6/11	55
Tampone congiuntivale	8/11	73
Tampone nasale	7/11	64
Tampone rettale	8/11	73
Tampone vescicale/urine	5/8	63

Ad un esito positivo di polmone e/o encefalo corrisponde almeno un esito positivo tra i tamponi congiuntivale, nasale o rettale, che si consiglia di prelevare in caso di sospetto per garantire la massima sensibilità del sistema diagnostico sia nei soggetti in vita che in quelli deceduti, associandoli, in questo caso, anche al cervello ed al polmone.

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

Risultati (4)

Esami istologici

Polmone: polmonite interstiziale, edema alveolare.

Encefalo: necrosi dei neuroni, demielinizzazione, lieve meningoencefalite.

Esami immunoistochimici

Polmone: positività delle cellule epiteliali e macrofagi alveolari.

Encefalo: positività multifocale dei neuroni.

Sequenze rilevate per i soggetti positivi tra il 2017 e il 2019

ANNO	PROVINCIA	SPECIE	SEQUENZA
2017	RIETI	VOLPE	Canine distemper virus isolate CDV599/2016, partial genome. Query cover 100%. Identity 100%. GenBank: KX545421.1
2018	AREZZO	LUPO	
	ROMA	VOLPE	
	ROMA	VOLPE	
2019	ROMA	CANE	Canine morbillivirus isolate BJ16C9, complete genome. Query cover 100%. Identity 100%. GenBank: MF926604.1

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

Risultati (5)

Esiti diagnostici campioni 2011-2018 mediante PCR

SPECIE	N° SOGGETTI	N° POSITIVI
CANE	85	9
FAINA	1	0
FURETTO	3	0
ISTRICE	1	0
LUPO	24	1
MARTORA	2	0
SCOIATTOLO	1	0
TASSO	13	0
VOLPE	51	4
N° TOTALE	**181**	**14**

Nel progetto sono stati inclusi anche dei campioni pervenuti tra 2011 e 2018 con sospetto Cimurro. Per 6 dei 14 soggetti positivi è stato possibile sequenziarli e le analisi filogenetiche hanno rilevato la presenza di un unico ceppo con almeno il 98% di identità e query cover con il ceppo CDV12254/2015, Accession Number KX024709.1 (Marcacci et al. 2014). Quest'ultimo ceppo appartiene al lineage "Artico" (Peserico et al., 2018, Di Sabatino et al., 2016).

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

Impatto e trasferibilità operativa (1)

DIAGNOSI IN VIVO

- L'introduzione nella diagnostica di laboratorio di tecniche molecolari rapidi e sensibili, come la PCR, consentirà di migliorare l'efficienza della diagnosi anche *in vivo*, sia ai fini della vaccinazione e dei trattamenti mirati, sia ai fini del contenimento della diffusione dell'infezione.

- I tamponi congiuntivale, nasale o rettale potranno essere utilizzati per una diagnosi rapida di Cimurro *in vivo*, migliorando l'efficacia del sistema diagnostico.

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

Impatto e trasferibilità operativa (2)

DIAGNOSI POST MORTEM

- I test molecolari potranno essere impiegati anche per la diagnosi *post-mortem* di Cimurro sostituendo l'immunofluorescenza diretta con un miglioramento in termini di rapidità ma soprattutto di sensibilità.

- L'implementazione dei test molecolari individuati, che danno anche la possibilità di caratterizzare i ceppi circolanti, potrà consentire di acquisire ulteriori elementi che potrebbero essere utili anche per valutare una correlazione tra uno specifico pattern istolesivo e differenti ceppi di CDV.

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

Conclusioni (1)

• Il nostro studio rileva che la diagnostica del Cimurro mediante **esami molecolari** è, nei confronti dell'IF, più sensibile, rapida e facilmente applicabile a matrici prelevabili anche ***in vivo***.

• In caso di un sospetto di Cimurro è importante prelevare il set completo di **tamponi congiuntivale, nasale e rettale** per massimizzare la sensibilità del sistema diagnostico sia nei soggetti in vita che in quelli deceduti, associandoli, in questo caso, anche al cervello ed al polmone.

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

Conclusioni (2)

• Le analisi filogenetiche condotte hanno rilevato la circolazione nel Lazio e nella Toscana del CDV599/2016 strain (KX545421.1) appartenente al lineage “Europe wildlife” ed in un cane del ceppo CDV/BJ16C9.

• L’esame delle sequenze rilevate a partire dai campioni pervenuti in Istituto a scopo diagnostico tra il 2011 e il 2018 ha evidenziato inoltre la circolazione di un ulteriore ceppo che corrisponde al CDV 12254/2015 (KX024709.1) (Di Sabatino 2016), appartenente al lineage “Artico ”.

Conclusioni (3)

- L'individuazione del ceppo CDV599/2016 strain (KX545421.1) appartenente al lineage "Europe wildlife" e del ceppo CDV 12254/2015 (KX024709.1), ne conferma la cocircolazione, come già rilevato da Di Sabatino (Di Sabatino et al., 2016).

- Il numero ridotto di soggetti positivi, per i quali è stato possibile effettuare il sequenziamento del virus, non ci consente di avere elementi sufficienti per la caratterizzazione istolesiva dei ceppi isolati, correlando la presenza di lesioni specifiche ad un determinato ceppo.