

29 novembre 2019
IZS Lazio e Toscana M. Aleandri
Roma, Via Appia Nuova, 1411

4.3 CREDITI ECM
per veterinari, biologi e
tecnici di laboratorio

L' ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA: principali risultati e loro trasferibilità operativa Roma, 19 giugno 2020



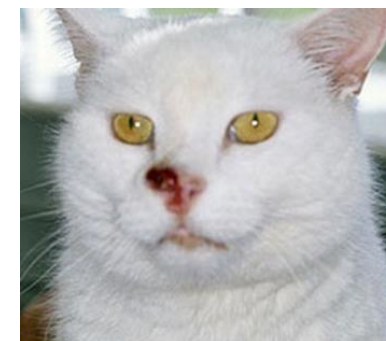
Progetto di RC IZSLT 03/15

“Il Papillomavirus felino e le neoplasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici per un virus oncogenico emergente”

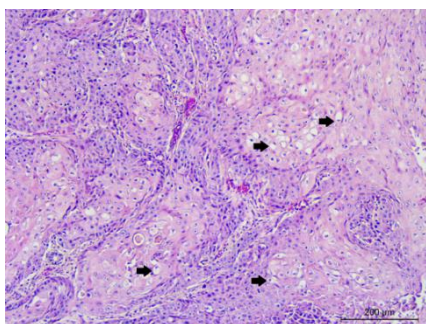


Giusy Cardeti, UOC Virologia
Responsabile scientifico

- U.O. IMS 1 – **Virologia**, *A.Cersini*
- U.O. IMS 2 – **Anatomia patologica e Istopatologia**, *C.Eleni*
- U.O. IMS 3 – **CeROVeC**, *A.Ferrari*
- U.O. EMS 1 – **Dip.to Med.Veterinaria e Produz.Animali, Università degli Studi di Napoli**, *G.Borzacchiello*



SCC – vetjournal.it



Epidemiologia Papillomavirus (PV) felini

1) Ricerche di carattere epidemiologico su infezioni da PV felino: focalizzate soprattutto su **FcaPV-2**

2) FcaPV2 evidenziabile anche in gattini: **infezione alla nascita**

(Munday et al, 2019) come per alcuni tipi cutanei di HPV; possibile

l'infezione **transplacentare** (Altamura et al, 2018)

3) La maggior parte dei gatti è infetta da FcaPV-2, ma evidenziati **Anticorpi** solo nel circa il **25%** dei gatti infetti

I PVs sono strettamente spp-specifici: dimostrato che il DNA di HPV evidenziato in gatti (Munday et al, 2007) è conseguente a contaminazione -> gli **HPVs non infettano il Gatto** e gli **FePVs non infettano l'Uomo** (Munday et al, 2019).

Unica eccezione il **Sarcoide felino** derivante da infezione cross-specifica da BPV-14; mai evidenziato in lesioni feline non sarcoidee sempre in gatti a contatto con bovini



Introduzione (2)



SCC – dojoanimali.it

- Nei felini il papillomavirus (FcaPV) è responsabile di differenti lesioni cutanee di natura ipertrofica-iperplastica (placca virale) e neoplastica:
 - benigna -> papilloma orale (PO)
 - maligna -> carcinoma Bowenoide in situ (**BISC**) e carcinoma a cellule squamose (**SCC**)
- spesso evolvono da lesioni pre-neoplastiche come la **cheratosi attinica**, di cui soffrono soprattutto animali anziani con mantello bianco nei siti anatomici maggiormente esposti agli UV (N.B.: lesioni non da PV)
- Gli SCC possono colpire anche la mucosa orale e sono tra i tumori più letali nel gatto domestico (*Felis catus*)
- I fattori causali scatenanti la trasformazione tumorale, non sono ancora noti
- Lesioni da PV sono state segnalate in felidi selvatici

Domestic cat (short-haired Persian cat)	<i>Felis catus</i>	<i>Felis catus</i> papillomavirus 1	FcaPV1 (FdPV1)	Lambdapapillomavirus 1	8300 AF480454	Cutaneous papilloma	Tachezy et al. (2002a)
Domestic cat		<i>Felis catus</i> papillomavirus 2	FcaPV2 (FdPV2)	Dyothetapapillomavirus 1	7899 EU796884	Pigmented plaque	Lange et al. (2009b)
Bobcat	<i>Lynx rufus</i>	<i>Lynx rufus</i> papillomavirus 1	LrPV1	Lambdapapillomavirus 1	8233 AY904722	Oral papilloma	Rector et al. (2007)
Asiatic lion	<i>Panthera leo persica</i>	<i>Panthera leo persica</i> papillomavirus 1	PlpPV1	Lambdapapillomavirus 1	8103 AY904724	Oral papilloma	Rector et al. (2007)
Raccoon	<i>Procyon lotor</i>	<i>Procyon lotor</i> papillomavirus 1	PIPV1	Lambdapapillomavirus 4	8170 AY763115	Cutaneous papilloma	Rector et al. (2005b)
Cougar (Florida panther)	<i>Puma concolor</i>	<i>Puma concolor</i> papillomavirus 1	PcPV1	Lambdapapillomavirus 1	8321 AY904723	Oral papilloma	Rector et al. (2007)
Snow leopard	<i>Uncia uncia</i>	<i>Uncia uncia</i> papillomavirus 1	UuPV1	Lambdapapillomavirus 1	8078 DQ180494	Papilloma lower lip	Rector et al. (2007)

Introduzione (3)

UOMO: agenti co-causali di tumori simili sono i **papillomavirus (PVs)**

FELIDI DOMESTICI E SELVATICI: pochi e geograficamente limitati i lavori pubblicati sull'associazione di queste forme tumorali con il papillomavirus felino (FcaPV)

Scarsi anche gli studi in grado di dimostrare che i PVs felini sono biologicamente attivi e non semplici ospiti temporanei.



FcaPV codifica per le proteine E6 ed E7, considerate oncogene in analogia con i PVs umani



E6 e E7 -> oncogeni, simili a quelli degli HR-HPV (cancro cervice)

E2 -> attività trascrizionale = virus biologicamente attivo nel tumore

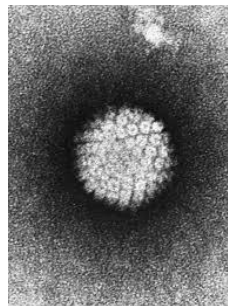


Il **progetto** si è proposto di **dimostrare il ruolo di FcaPV-2 nel determinismo degli SCC mucosali e cutanei del gatto.**





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



Papillomavirus



Obiettivi specifici del Progetto (1)

Valutare la presenza di DNA virale e l'espressione dei potenziali oncogeni di FcaPV-2 in neoplasie cutanee e mucosali in felidi domestici, selvatici ed esotici

- Mettere a punto tecniche biomelocolari per la diagnosi di papillomavirus.
- Utilizzo di tali tecniche, tra cui la RCA (Rolling Circle Amplification) PCR per la diagnosi di PVs nel carcinoma squamoso del gatto e di felini selvatici
- Correlare filogeneticamente i ceppi identificati a quelli precedentemente isolati, descritti in letteratura nelle neoplasie cutanee e mucosali di specie animali domestiche e non



Obiettivi del Progetto (2)

Indagini condotte ad ampio spettro



-Dimostrare il possibile ruolo di FcaPV-2 nelle neoplasie cutanee e mucosali benigne e maligne dei felidi domestici (e selvatici)

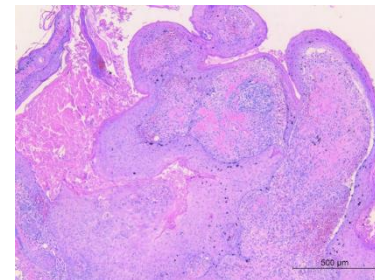
- utili per un approccio epidemiologico



-> valutare la diffusione del virus



-> indirizzare alla formulazione futura di prodotti terapeutici e/o profilattici per trattare e prevenire queste debilitanti neoplasie cutanee dei felini



Carcinoma a Cellule
Squamose



ESAME ANATOMO-PATOLOGICO

Prelievo lesioni cutanee e mucosali neoplastiche da animali pervenuti per esame necroscopico

Biopsie

Prelievo lesioni cutanee e mucosali neoplastiche da animali vivi; per gli esotici, in corso di interventi chirurgici o comunque quando anestetizzati per altre ragioni

ESAME ISTOLOGICO

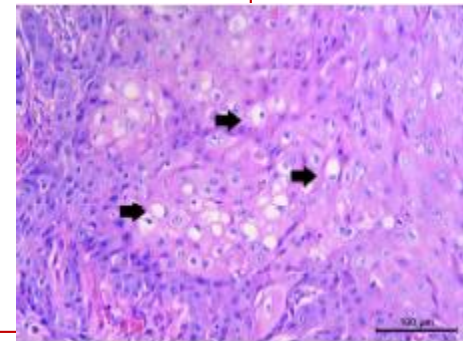
Colorazione Ematossilina-Eosina

ESAME IMMUNOISTOCHEMICO

- MAb anti-HPV1 clone K1H8; Ac secondario perossidato + DAB come cromogeno
- MAb anti-p16 -> marker tumorale in OSCC umano, pathway pRb

IBRIDAZIONE IN SITU (ISH)

Sonda per DNA FcaPV-2 marcata con digossigenina



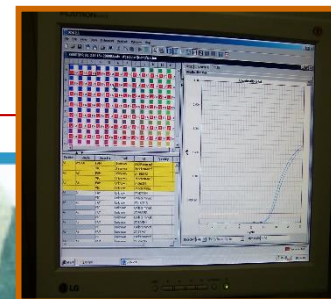
ESAMI VIROLOGICI

Tecniche biomolecolari sviluppate e applicate

- Rolling Circle Amplification (RCA) PCR: utilizzata per la ricerca di virus con genoma a DNA circolare
- n.2 Pan-Papillomavirus-Codehop PCR (primer PAP e FAP): riconoscono porzioni genomiche ben definite all'interno della famiglia *Papillomaviridae*
- n.2 PCR specifiche per FcaPV-2 (primer JMP e E2): riconoscono sequenze altamente conservate nell'ambito del genoma di FcaPV-2
- PCR specifica per il gene L1 di FcaPV-2 applicata sui SCC localizzati alla testa

Tecniche di Microscopia Elettronica in colorazione negativa

Metodo dell'ultracentrifugazione





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

Risultati (1)

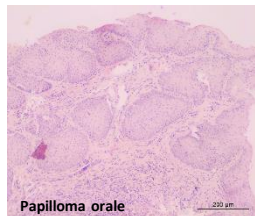
**Pan-papillomavirus CODHEOP PCR_FAP e PAP e PCR
JMP e PCR E2 a confronto con ME e Es.istologico**

Tabella n.1

Campioni esaminati istologicamente e Risultati

**n. 85 c. -> 27 lesioni mucosali
(25 cavo orale; 2 naso)**

- **81** SCC cute e mucose
- **2** papillomi orali
- **2** cheratosi attinica



Papilloma orale

I prodotti delle **PCR FAP e PAP** sono stati sequenziati:
presenza di **FcaPV-2**; 100%
identità di sequenza e 99%
query-cover con la
sequenza **A.N.**
**EU796884.1, Feline
Papillomavirus type 2
isolate Main Coon 2007**

Confermati i **6 POS** anche
con le **PCR JMP e E2**
specifiche per FcaPV-2

Anno raccolta campioni	N° campioni	PCR FAP e PAP	PCR JMP	PCR E2	ME	Esame istologico	Tipologia di organi fissati in formalina ed inclusi in paraffina
2013	5	NEG	1POS	1 POS	NE	Carcinoma a Cellule Squamose	Padiglione auricolare, bocca, gengiva, naso
2014	11	NEG	0	0	NE	SCC cute	Padiglione auricolare, gengiva, mascella, lingua, esofago, mucosa nasale, dito
2015	9	1 POS	3 POS	1 POS	NE	SCC cute	Padiglione auricolare, gengiva, mandibola, occhio, naso, seni nasali
2016	11	NEG	7 POS	9 POS	1 POS	SCC cute	Padiglione auricolare, mandibola, labbro, sopraorbitale, naso, seni nasali, dito
2017	12	NEG	1 POS	1 POS	2 POS	SCC cute, SCC orale (1), papillomi multipli lingua, cheratosi attinica	Padiglione auricolare, gengiva, lingua, polmone, naso, reg. inguinale, dorso
2018	36	4 POS	12 POS	14 POS	1 POS	SCC, SCC orale (7)	Padiglione auricolare, condotto uditivo, gengiva, mandibola, lingua, occhio, reg. perioculare, reg. occipitale, palpebra, brush nasale, naso, tampone nasale, mucosa nasale, mento, dito, addome, coscia, mammella
2019	4	1 POS	3 POS	2 POS	NEG	SCC cute, SCC orale (3), papilloma orale	Lingua, palato, gengiva, cavità orale/guancia
Totale campioni	88 campioni	6 POS/82 NEG	27 POS/61 NEG	28 POS/60 NEG	4 POS/19 NEG (tot. 23 c.)	SCC cute, SCC orale, papilloma orale, cheratosi attinica	
% Positivi		6,81% POS	30,68% POS	31,81% POS	17,39 % POS		





Tabella n.2

N° soggetti	N. Organi	Tipologia di organi fissati in formalina ed inclusi in paraffina	Diagnosi	PCR FAP e PAP	PCR JMP	PCR E2
28	34	Pinna auricolare, mucosa palato, cavità orale, lingua, gengiva, mascella, naso, narice, polmone, cute, linfonodo	SCC, cheratosi attinica	10 POS / 24 NEG	7 POS / 27 NEG	12 POS / 22 NEG
		% Positività		29,41%	20,58%	35,29%



- 5 camp./10 POS in PCR FAP e PAP sono risultati POS in entrambe le PCR JMP e E2.

- Gli amplificati delle **PCR JMP e E2** hanno mostrato: identità di sequenza del 99% e query-cover del 91% con la sequenza **A.N. NC_038520.1, Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007**

Osservazione al Microscopio Elettronico a Trasmissione (4 pos/23 camp.)

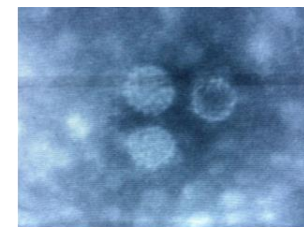


Philips EM 208



FcaPV2 Gatto, padiglione auricolare
© G. Cardeti (IZSLT, Roma)

Particelle nude, a struttura
icosaedrica 50-55 nm



FcaPV2 Gatto, mucosa linguale
© G. Cardeti (IZSLT, Roma)





Risultati (3)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Attività UO Università di Napoli: FcaPV-2 in FOSCC (SCC orali felini)

n. 25/88 (IZSLT) + 7/34 (CeROVeC) campioni di FOCCS inviati all'U.O. Università di Napoli

✓ PCR

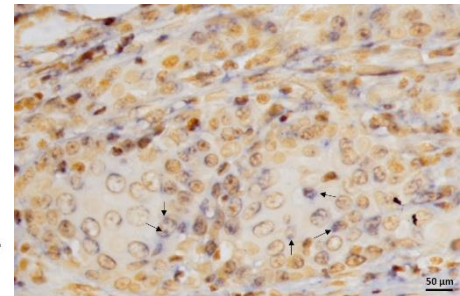
- Primers degenerati (Es. FAP59/64): amplificazione frammenti lunghi (400-500 bp)
- ✓ **Primers tipo-specifici: amplificazione frammenti più corti (JMPF/R)**
- Gene L1, amplicone di 177 bp
- ✓ **RISULTATI: 10/32 FOSCC FcaPV-2 DNA + (31%)**

✓ Ibridazione in situ (ISH)

- Sonda per DNA FcaPV-2 marcata con digossigenina
- ✓ **RISULTATI: segnale di ibridazione in 4/9 FcaPV-2 DNA + FOSCC (44%)**

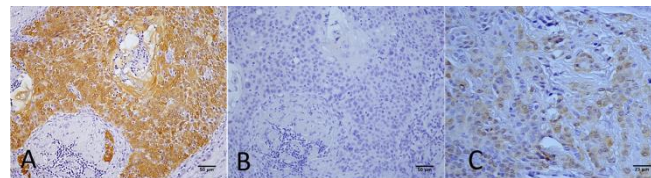
✓ Reverse transcription (RT-) PCR per geni virali

- L1 (capside) → infezione produttiva
- E2 (regolazione trascrizione virale) → Virus biologicamente attivo
- E6E7 (oncogeni) → Trasformazione neoplastica
- ✓ **RISULTATI: Trascrizione geni virali FcaPV-2 in 7/10 FOSCC (70%)**
- L1: 5/10 (50%)
- E2: 3/10 (33%)
- E6E7: 5/10 (50%)



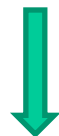
✓ Immunoistochimica p16

- Marker di infezione da PV in OSCC umano, pathway pRb
- ✓ **RISULTATI: espressione p16 in 6/9 campioni (69%)**
- 4/9: colorazione intensa in 80-90% cellule neoplastiche (A)
- 2/9: colorazione moderata in 20-30% cell. neoplastiche (B)



Impatto e trasferibilità operativa (1)

I risultati del progetto indicano che l'utilizzo di PCR con primer tipo-specifici può essere utile per l'individuazione di tumori virus-indotti anche nel gatto, accompagnato da analisi di RT-PCR, ISH e IHC per p16, in maniera simile alla controparte umana.



- ✓ Possibili ripercussioni future in ambito diagnostico e prognostico dei FOSCC, una delle entità patologiche più importanti in oncologia felina.
- ✓ Gatto come possibile modello animale: i FOSCC positivi per FcaPV-2 presentano analogie con gli OSCC umani positive per HR-HPV
- ✓ Indagine epidemiologica sulla diffusione di tumori associati all'infezione da FcaPV



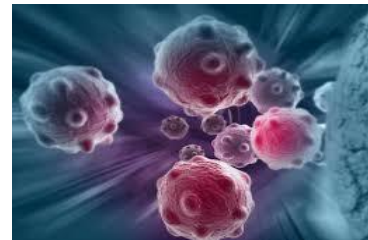


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Impatto e trasferibilità operativa

(2)

PCR JMP e PCR E2



- Le 2 PCR possono essere applicate su campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina in quanto **non risentono della frammentazione del DNA estratto** dato che **portano ad amplificati di piccole dimensioni (PCR JMP: 177 bp e PCR E2: 126 bp)**
- Per la **ricerca del FcaPV-2** è importante utilizzare contemporaneamente le 2 PCR perché le **2 coppie di primer (JMP ed E2)** possono lavorare in maniera diversa contribuendo ad aumentare l'attendibilità dei risultati
- **L'alta % di concordanza tra PCR JMP (42,5% e 20,58% campioni positivi rispettivamente IZSLT e CeROVeC) e PCR E2 (45,4% e 35,2% campioni positivi rispettivamente IZSLT e CeROVeC) valida ulteriormente i risultati ottenuti, ossia la presenza del FcaPV-2 nei campioni esaminati**



Conclusioni (1)

- ✓ Una percentuale di FOSCC è associata ad infezione da FcaPV-2 (PCR, ISH)
- ✓ L'infezione è attiva e può essere produttiva (espressione E2 ed L1)
- ✓ Il virus può avere attività trasformante (viral load, espressione E6E7, p16)
- ✓ Gatto come modello animale: FOSCC-FcaPV2 positivo analogo a OSCC umano-HR_HPВ positivo

Prospettive future

- ✓ In OSCC umano, screening HPV mediante IHC p16, PCR, ISH, espressione genica. Le medesime tecniche sono applicabili ai FOSCC: è tempo di eseguire screening e follow-up?
- ✓ Possibili implicazioni prognostiche: FOSCC FcaPV-2 pos vs tumori non virali
- ✓ Profilassi: allestimento vaccino anti-FcaPV2 alla stessa stregua del vaccino anti-HR_HPВs

HNSCC

FOSCC





Ruolo dei PVs nello sviluppo malattie cutanee e mucosali del gatto

1) sempre più riconosciuto

- Probabile proposta di subclassificazione delle malattie cutanee del gatto in SCC-PV pos e SCC-PV neg -> prognosi più accurata e terapia più mirata (Munday et al, 2019)
- In studio associazione SCC mucose e FcaPV-2

2) possibilità di **prevenire** tali malattie

Produzione di farmaci per adiuvare il Sistema Immunitario nel controllo della replicazione virale a prevenzione della forma clinica

