

Ricerca Finalizzata 2005

Sviluppo di metodi diagnostici per la sorveglianza delle neuropatologie di origine virale degli equini

Responsabile scientifico: Dr. Gian Luca Autorino

Durata del progetto : 24 mesi

Elenco delle Unità Operative (U.O.) impegnate nel progetto:

- 1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – Rappresentante Legale Renzo Nazareno Brizioli
- 2) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lombardia ed Emilia Romagna – Rappresentante Legale Ezio Lodetti
- 3) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Piemonte Liguria e Valle d'Aosta – Gregorio Borsano
- 4) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Rappresentante Legale Igino Andrighetto
- 5) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Umbria e Marche – Rappresentante Legale Guido Petracca
- 6) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna – Piras Vincenzo
- 7) Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Rappresentante Legale Antonio Limone
- 8) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Puglia e Basilicata – Rappresentante Legale Giuseppe Valerio
- 9) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Rappresentante Legale Andrea Antonio Riela
- 10) Università degli Studi di Milano – Facoltà di Medicina Veterinaria – Rappresentante Legale Enrico Decleva
- 11) UNIRELAB s.r.l. unipersonale– Rappresentante Legale Francesco Morelli
- 12) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – Rappresentante Legale Renzo Nazareno Brizioli
- 13) Università degli Studi di Pisa – Facoltà di Medicina Veterinaria – Rappresentante Legale Giovanni Braca

Breve sintesi delle conoscenze già disponibili sull'argomento

Le malattie virali responsabili di sindromi encefaliche degli equidi sono causate da diverse famiglie virali che hanno una diffusione cosmopolita e possono determinare notevoli ripercussioni sullo stato di salute delle popolazioni animali nonché un significativo impatto economico sulle produzioni e gli scambi degli animali appartenenti a tali specie. Accanto alle infezioni più diffuse e conosciute causate dall'EHV 1, e solo di recente dall'EHV 4, responsabili di sindromi encefaliche sporadiche associate alla rinopolmonite equina, viene attribuita importanza anche ad altri agenti virali. Alcuni di questi virus assumono rilevanza di sanità pubblica, o in virtù del loro potenziale zoonosico, o perché in grado di infettare sia gli equini che l'uomo, senza trasmissione reciproca tra i due ospiti. A causa dei recenti focolai epidemici nelle popolazioni equine rilevati in Italia, Francia, Stati Uniti e Nord Africa e delle evidenze di circolazione virali in popolazione umana dell'Est Europa, Stati Uniti, Israele e recentemente in Portogallo, ha assunto importanza anche nel nostro paese l'encefalomielite causata dal virus West Nile (WN).

Crescente attenzione viene posta anche nei confronti di una meningoencefalite nota da tempo negli equini e negli ovini come Malattia di Borna, ma solo recentemente caratterizzata eziologicamente con l'isolamento e la tipizzazione di un RNA-virus (BDV) a singolo filamento, classificato

nell'ordine *Mononegavirales*, famiglia dei *Bornaviridae*. Tale virus, frequentemente isolato in Europa centrale, ha un'ampia distribuzione geografica ed un ampio spettro d'ospite che include anche l'uomo, nel quale si sospetta un'associazione con forme di disturbi mentali e comportamentali. In Germania, il virus è stato considerato come la prima causa di malattie del sistema nervoso centrale negli equidi. La presenza di BDV è stata segnalata anche in Austria, Svizzera e Francia. Nel nostro Paese la malattia è stata segnalata da Caramelli et al. nel 1996, in ovini piemontesi con sintomatologia neurologica progressiva. Le indagini sono state intraprese nell'ambito della sorveglianza sulle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili nel 1998, nella cui diagnosi differenziale il BDV deve essere considerato a causa del quadro clinico. Da una ricerca condotta nel triennio 2000-2003 è emersa la presenza sia di positività sierologiche, sia alla RT-PCR eseguita su SNC di bovini e ovini con meningo-encefalite non purulenta. Tuttavia la modesta concentrazione di virus nei tessuti e le difficoltà di isolamento rendono necessario l'impiego di strumenti diagnostici di elevata sensibilità e specificità. Ad oggi non sono disponibili dati circa la sua diffusione nella popolazione equina in Italia.

Rispetto alle infezioni sostenute dai virus citati la diagnosi clinica differenziale spesso non è possibile a causa di sintomatologie comuni, pertanto risultano indispensabili gli accertamenti di laboratorio.

Ad eccezione dei due virus erpetici citati, per i quali è noto il tropismo limitatamente alla specie equina, per quanto riguarda la manipolazione di materiale biologico e dei virus WN e BD sono possibili i rischi d'infezione per gli addetti alle attività di laboratorio.

Per quanto riguarda la diagnosi diretta sono già disponibili metodi molecolari per la ricerca dei virus menzionati che tuttavia non consentono una rapida diagnosi differenziale fra le varie infezioni. Non esistono inoltre metodi immunoenzimatici per la ricerca diretta dei virus. Sulla base delle conoscenze e dei dati disponibili in letteratura, in particolare per quanto riguarda il BDV, gli attuali metodi di diagnosi indiretta sierologica non sembrano avere caratteristiche di elevata specificità.

Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre

Attraverso il presente progetto si vogliono sviluppare nuove metodiche diagnostiche e migliorare metodi analitici in uso per la diagnosi di alcune delle encefalomieliti virali presenti nel continente europeo, non ancora oggetto di diagnosi specifica nel nostro paese. Ulteriore obiettivo è la standardizzazione e/o validazione di metodi a basso rischio biologico in ambito nazionale.

Non essendo stata messa a punto una metodica che renda possibile una rapida diagnosi differenziale, si vogliono realizzare diverse PCR Real Time che consentano l'esecuzione simultanea di ricerche nei confronti di più agenti eziologici, responsabili di sindromi neurologiche nell'uomo e negli equini. Sarà anche studiato un altro sistema diagnostico simultaneo basato sull'impiego di microarray per l'identificazione e la tipizzazione di questi patogeni virali in un'unica sessione di analisi. Si vuole inoltre migliorare la sensibilità e la specificità dei test sierologici mediante la produzione di anticorpi monoclonali.

I risultati ottenuti con i metodi descritti saranno comparati con lo studio descrittivo delle lesioni neuropatologiche eventualmente accertate. Gli strumenti diagnostici realizzati potranno essere utilizzati nella rete di sorveglianza nazionale per le patologie degli equini che, allo stesso tempo, potrà dare indicazioni relative alla circolazione di agenti patogeni anche per la popolazione umana.

Metodologia

WP 1: Realizzazione di PCR Real Time simultanee e di tecnologia microarray per EHV 1, EHV 4, WNDV E BDV

- Sviluppo di metodi PCR Real Time per EHV 1, EHV 4, WNDV e BDV
- Messa a punto di metodi di estrazione di DNA/RNA da diverse matrici biologiche
- Messa a punto di metodi di preparazione campione per tecnologia microarray
- Messa a punto e standardizzazione di condizioni di spottaggio e ibridazione del microarray

- Sviluppo e standardizzazione di una PCR simultanea per i 4 virus sopra citati
- Valutazione della sensibilità e ripetibilità dei risultati
- Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati

WP 2: Produzione di reagenti da impiegare nelle prove immunologiche

- Produzione dei diversi stipti virali in colture cellulari e purificazione degli stessi
- Immunizzazione di topi Balb/c per la produzione di anticorpi monoclonali
- Caratterizzazione dei monoclonali in termini di specificità ed avidità

WP 3: Sviluppo di metodi diagnostici immunologici

- Produzione e acquisizione di sieri positivi e negativi per i diversi virus
- Definizione dei metodi immunologici da impiegare per la diagnosi delle diverse infezioni
- Preparazione di anticorpi coniugati da impiegare in prove immunoenzimatiche
- Definizione delle condizioni operative di diversi metodi immunoenzimatici sviluppati e/o messi a punto
- Definizione dei diversi valori di cut-off impiegando sieri sicuramente positivi e negativi
- Effettuazione di controlli di precisione, ripetibilità, riproducibilità ed accuratezza dei metodi
- Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati

WP 4: Organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio

- Definizione della metodologia per la esecuzione delle prove interlaboratorio
- Allestimento di serie di campioni biologici per l'esecuzione delle prove interlaboratorio con i metodi di diagnostica molecolare ed i metodi sierologici
- Trasferimento di protocolli diagnostici e di materiali di riferimento alle U.O. partecipanti al circuito
- Esecuzione delle prove
- Elaborazione statistica dei dati per la valutazione della ripetibilità, riproducibilità e concordanza

Trasferibilità dei risultati prodotti

Secondo quanto previsto dall'art. 2 del Decreto ministeriale 4 ottobre 1999 i metodi sviluppati e standardizzati con la presente ricerca saranno trasferiti dal Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini alla della rete nazionale dei Laboratori Ufficiali.

I risultati delle diverse attività saranno pubblicati su riviste scientifiche, presentati nell'ambito di manifestazioni scientifiche, eventi formativi per il personale del SSN e per i professionisti operanti nel settore e resi disponibili agli Uffici competenti del Ministero della Salute, alle Regioni ed ai referenti degli Istituti Zooprofilattici.

L'implementazione di metodi diagnostici innovativi, validi, di rapida esecuzione, a basso costo costituirà un supporto indispensabile per l'attivazione di efficienti sistemi di sorveglianza, consentendo di produrre evidenze di eventuale circolazione virale, premessa fondamentale per le scelte e la gestione degli interventi sulle popolazioni animali ed umane.

Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Le strutture e le Università partecipanti al progetto sono una rete integrata di laboratori di ricerca e di servizio in grado di apportare specifici contributi scientifici per la realizzazione di metodiche diagnostiche innovative, garantendo un approccio multidisciplinare, attraverso il coinvolgimento di virologi, immunologi, biologi molecolari e neuropatologi. Gli IIZZSS, oltre ad aver sviluppato competenze specialistiche diversificate, gestiscono una trama di laboratori omogeneamente distribuita nel Paese, che svolgono azioni di Sanità Pubblica e Sanità Veterinaria. UNIRELAB ha attivato un servizio di anatomo-patologia per gli allevatori di equini ed operatori del settore, riconducendo agli IIZZSS le attività diagnostica nei confronti delle malattie infettive e diffuse ed inviando agli stessi i campioni prelevati in caso di sospetto clinico. L'integrazione di tali competenze è in grado di avviare, già nel corso di esecuzione della ricerca, le prime azioni di sorveglianza epidemiologica nei confronti di tali infezioni virali.

Articolazione del programma

FASE 1: Sviluppo di metodi diagnostici diretti ed indiretti

- a) Produzione e acquisizione di sieri positivi e negativi per i diversi virus e di stipiti virali di campo e di riferimento (U. O.: 1, 2, 3, 12)
- b) Studio dei diversi genomi virali per la scelta delle regioni target da sottoporre ad amplificazione (U. O. : 1, 10)
- c) Selezione dei primers idonei per l'impiego in PCR Real Time (U. O. : 1)
- d) Definizione e verifica di condizioni operative comuni per l'esecuzione simultanea delle 4 PCR Real Time (U. O. : 1)
- e) Valutazione di diversi metodi di estrazione di DNA/RNA da diverse matrici biologiche (U.O. 1)
- f) Valutazione della sensibilità assoluta e relativa delle PCR Real Time per i diversi agenti eziologici e, ove possibile, rispetto a metodi di confronto (U. O. : 1)
- g) Valutazione della specificità delle diverse PCR Real Time nei confronti di ceppi di diversa origine (U. O.: 1)
- h) Produzione dei diversi stipiti virali in colture cellulari e purificazione degli stessi (U. O. : 2)
- i) Produzione di anticorpi monoclonali per almeno due virus, caratterizzazione e selezione degli stessi in funzione della specifica avidità ed affinità rispetto agli epitopi degli antigeni ed in relazione ai possibili diversi impieghi nei metodi immunologici. Preparazione degli anticorpi marcati (U. O. : 2)
- j) Definizione dei metodi immunologici da impiegare per la diagnosi indiretta delle diverse infezioni (U. O. : 2, 3, 12)
- k) Definizione e verifica delle condizioni operative per metodi immunoenzimatici ed immunostochimici sviluppati e/o messi a punto per almeno 2 virus (U. O.: 2, 3, 12, 13)
- l) Design delle sonde specifiche per la tecnologia microarray (U.O. 10)
- m) Messa a punto dello spottaggio del vetrino per tecnologia microarray (U.O. 10)
- n) Valutazione di diversi metodi per la preparazione del campione da diverse matrici biologiche per tecnologia microarray (U.O. 10)
- o) Valutazione di diverse condizioni di ibridazione del microarray (U.O. 10)
- p) Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati (U. O. : 1, 2, 3, 10, 12)
- q) Valutazione preliminare delle caratteristiche di precisione ed accuratezza dei diversi metodi (U. O. : 1, 2, 3, 10, 12)

Fase 2: Organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio

- a) Definizione della metodologia per la esecuzione delle prove interlaboratorio (U. O. : 1, 2, 12)
- b) Allestimento di serie di campioni biologici per l'esecuzione delle prove interlaboratorio con i metodi di diagnostica molecolare ed i metodi sierologici messi a punto (U. O. : 1, 12)
- c) Trasferimento di protocolli diagnostici, di materiali di riferimento e campioni alle U.O. partecipanti al circuito (U. O. : 1, 2, 3, 12)
- d) Esecuzione delle prove e trasferimento dei risultati (U. O. : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12)
- e) Elaborazione statistica dei dati per la valutazione della ripetibilità, riproducibilità e concordanza (U. O. : 1, 12)

Fase 3: Verifica dei metodi messi a punto

- a) Prelievo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti (U. O. : 11, 13)
- b) Controllo degli stessi con i metodi messi a punto (U. O. : 1, 2, 3, 10, 12, 13)
- c) Caratterizzazione di eventuali stipiti rilevati nel corso delle attività di cui al punto b) (U.O.: 1, 2, 10)
- d) Elaborazione statistica dei risultati per tecnologia microarray (U.O. 10)

Fase 4 : Relazioni tecniche

- a) I° report – 4° mese (U.O. : 1, 2, 3, 10, 12)
- b) III° report – 12° mese (U.O. : 1, 2, 3, 10, 12)
- c) IV° report / relazione intermedia – 14° mese (coordinatore scientifico)
- d) V° report – 16° mese (U.O. : 1, 2, 3, 12)
- e) VI° report – 20° mese (U.O. : 1, 2, 3, 10, 12)
- f) VII° report – 23° mese (U.O. : 1, 2, 3, 10, 12)
- g) VIII° report / relazione finale – 24° mese (coordinatore scientifico)

Output del programma

4° mese: disponibilità di materiali di riferimento e individuazione delle sequenze dei primers e delle sonde per tecnologia microarray

6° mese: corso di formazione sulle infezioni virali del sistema nervoso centrale del cavallo e presentazione del progetto, rivolto agli operatori del SSN ed ai professionisti operanti nel settore

12° mese: disponibilità di anticorpi monoclonali. Sviluppo di metodi PCR Real Time

14° mese: consegna alla Commissione Ricerca dell'elaborato intermedio

20° mese: costituzione di panels di sieri e campioni biologici positivi e negativi da impiegare in circuiti interlaboratorio. Disponibilità di un elaborato relativo al metodo da impiegare per le prove interlaboratorio. Sviluppo di tecnologia microarray.

24° mese: Consegna alla Commissione Ricerca dell'elaborato finale. Realizzazione di un evento formativo per la presentazione dei prodotti della ricerca.

Obiettivi intermedi previsti

OBIETTIVI:

Sviluppo di metodi PCR Real Time da effettuare simultaneamente.

Sviluppo di tecnologia microarray per la diagnosi e la caratterizzazione dei virus oggetto di studio.

Messa a punto di metodi ELISA e di metodi immunoistochimici sensibili e specifici.

INDICATORI:

Numero di procedure operative standard elaborate e distribuite. Reagenti e materiali di riferimento da impiegare nell'esecuzione delle prove consegnati ai diversi laboratori. Report relativo alla elaborazione dei dati ottenuti nelle prove interlaboratorio ai fini della validazione dei metodi.