

"Problematiche legate ai piani nazionali di sorveglianza delle malattie infettive nella popolazione equina: l'esempio fornito dall'applicazione dell'O.M. 14.11.2006 relativa all'Anemia Infettiva Equina"

Aggiornamenti dell'iter diagnostico

Dr.ssa Laura Gasperetti

C.R.A.I.E. IZSLT - Sez. Pisa



Montecassiano - 24 maggio 2010

Classificazione di EIAV

Six Retrovirus Gen.:

Subfamily/ Genus _____ Examples _____

Orthoretrovirinae

Alpharetrovirus Avian Sarcoma and Leukemia

Betaretrovirus Mouse Mammary Tumor (MMTV)
Mason Pfizer monkey (MPMV)
Ovine pulmonary adenocarcinoma virus (Jaagsiekte sheep
retrovirus-JSRV)

Deltaretrovirus Human T-cell Leukemia Virus (HTLV)
Bovine Leukemia Virus (BLV)

Gammaretrovirus Murine Sarcoma and Leukemia
Feline Leukemia Virus (FeLV)

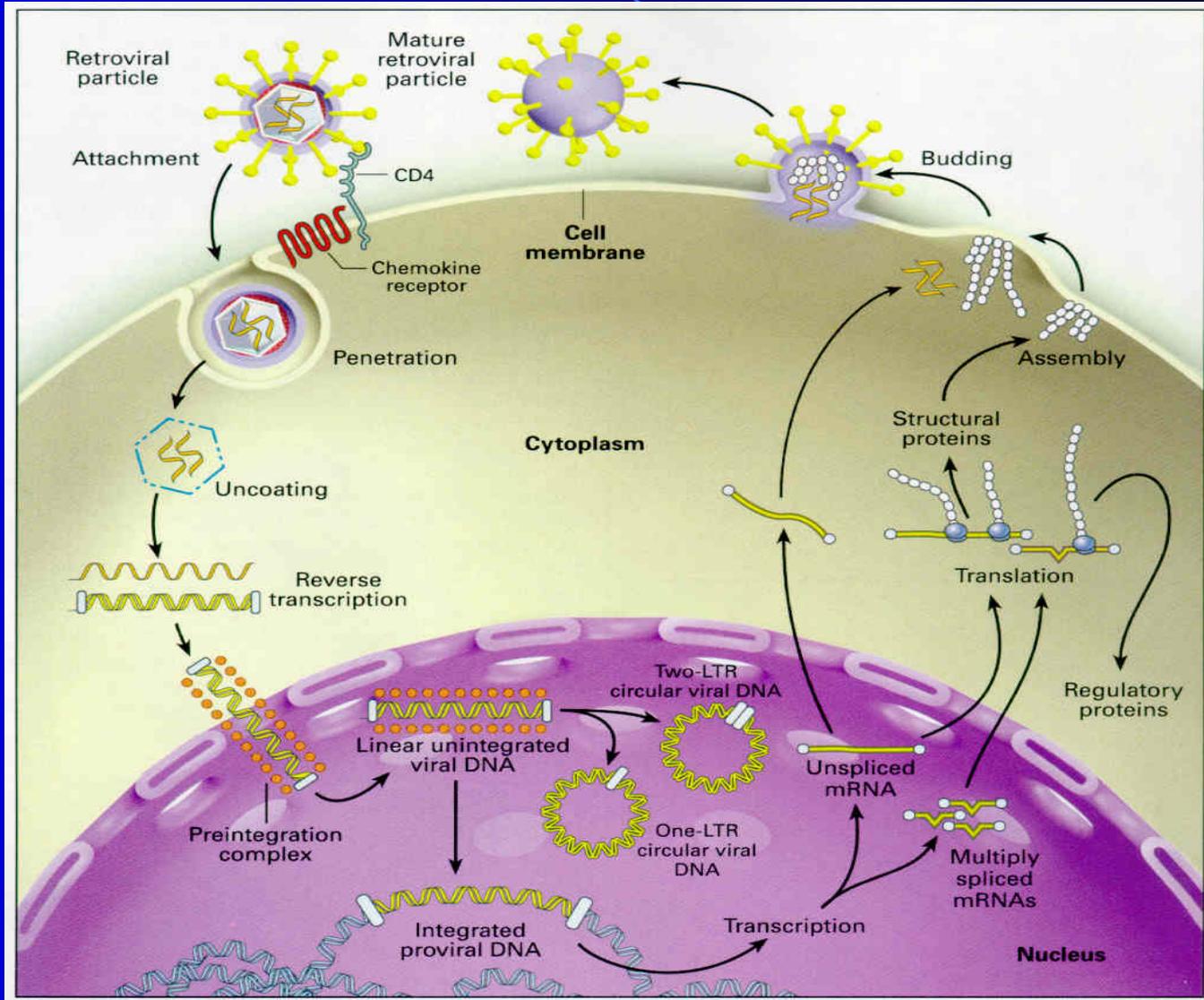
Lentivirus HIV, SIV, BIV, FIV, CAEV, MVV, **EIAV**

Spumaretrovirinae

Spumaretrovirus Human Foamy virus (cytopathic in vitro, no disease
association); FFV



Ciclo replicativo di EIAV



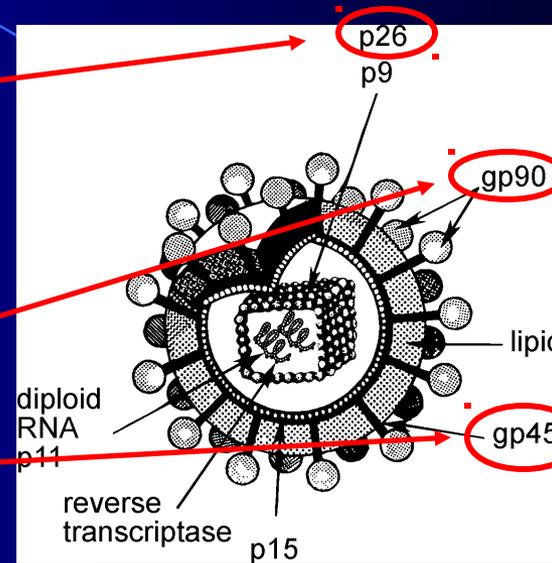
Caratteristiche virali

- L'RNA virale serve da stampo per la produzione di DNA (cDNA)
- Il DNA provirale può integrarsi nel genoma della cellula ospite e rimanervi in forma latente.
- Elevata capacità di variazioni genetiche e/o antigeniche
 - * A carico delle gp dell'envelope (trascrittasi inversa/ 2 molecole di RNA)
 - * Consente di sfuggire alla risposta anticorpale
 - * E' alla base dei ricorrenti cicli viremici
 - * Il soggetto infetto sviluppa un'importante reazione anticorpale
 - * In un cavallo infettato sperimentalmente durante gli episodi febbrili sono stati isolati fino a 6 ceppi di EIAV con variabilità nel gp90
 - * La proteina meglio conservata è la p26

Struttura genoma di EIAV

Table 1--Structural and regulatory proteins coded by the EIAV genome

Gene	Protein	Molecular weight	Function
gag	p26	26,000	Major capsid
	p15	15,000	Matrix
	p11	11,000	Nucleoprotein
	p9	9,000	Capsid
pol	PR		Protease
	RT		Reverse transcriptase
	DU		RNase H dUTPase
	IN		Integrase
env	SU	90,000	Surface unit
	TM	45,000	Transmembrane
S1	tat		Transactivator
S2	?		?
S3	rev-like		Inhibits RNA splicing



Organizzazione del genoma provirale



gag : p15, p26, p11, p9

pol : Pro, RT, dUTP, Integrase

env : SU, TM

Diagnosi di AIE

- * **Clinica:** sintomi osservabili durante la viremia e altamente variabili
- * **Sierologica:** Anticorpi svelabili 20 gg P.I
- * **Molecolare:** attualmente in fase sperimentale e comunque possibile solo durante gli episodi febbrili

Diagnosi Sierologica di AIE

- * AGID (Coggins test e AGID OIE) test ufficiale
Ricerca di Ab diretti contro la p26
- * Tests ELISA
Ricerca Ab diretti contro p26; p26 e gp45
- * Immunoblotting
Ricerca Ab diretti contro: p26, gp90 & gp45

Riferimenti Normativi

* Test di COGGINS

→ *DM 4 dicembre 1976*

N.B. E' il test ufficialmente riconosciuto in Italia per la conferma dei positivi di AIE .

* AGID metodo OIE ed ELISA

→ *Manuale OIE 6ª Edizione 2008*

→ *Comunicato Min. Sal. in GU n. 66 del 21-03-2005*

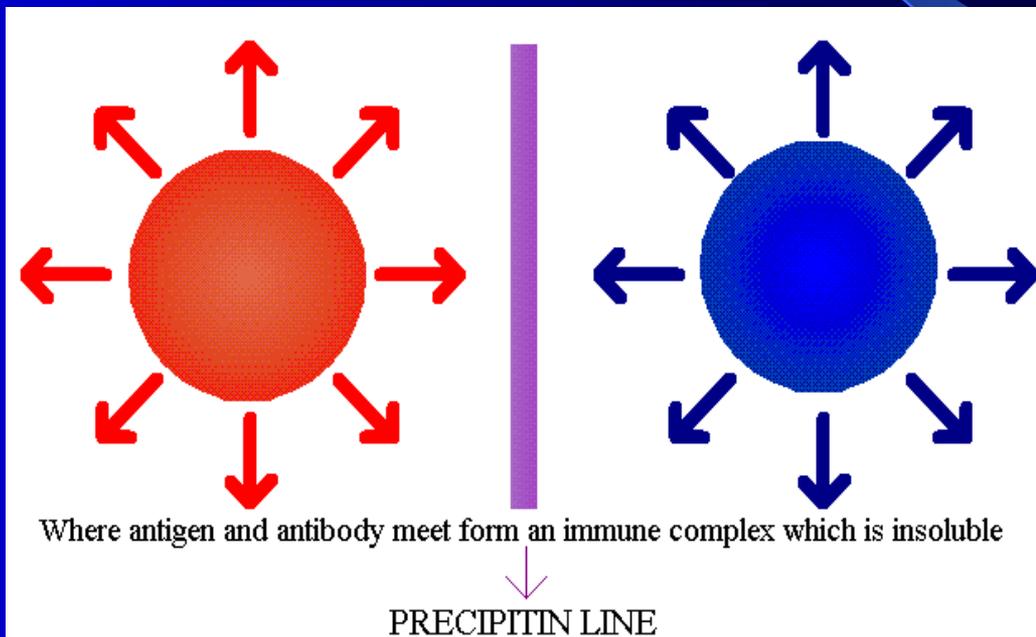
→ *Nota Min. Sal. 12 Marzo 2007*



Immunodiffusione in gel di agar (AGID)

Principio del metodo: reazione di precipitazione

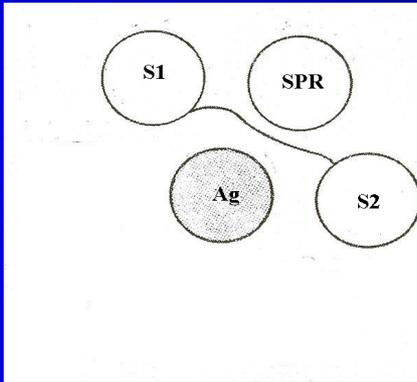
Ag
(p26)



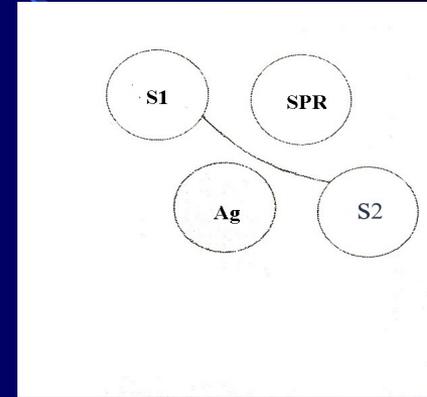
Ab

Immunodiffusione in gel di agar (AGID)

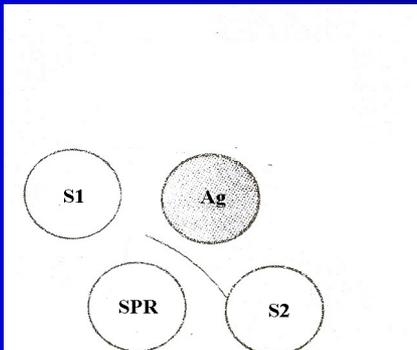
Lettura della reazione: LINEA DI IDENTITA'



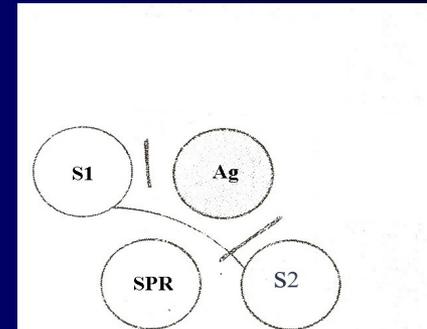
REAZIONE POSITIVA



REAZIONE NEGATIVA



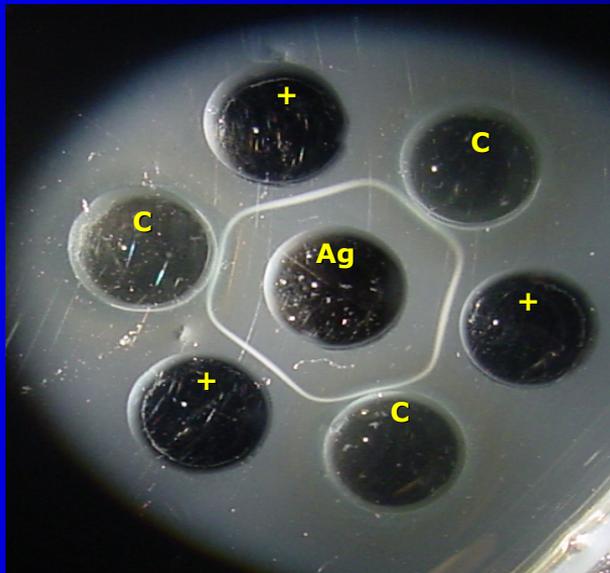
ECCESSO DI Ab



REAZIONE ASPECIFICA

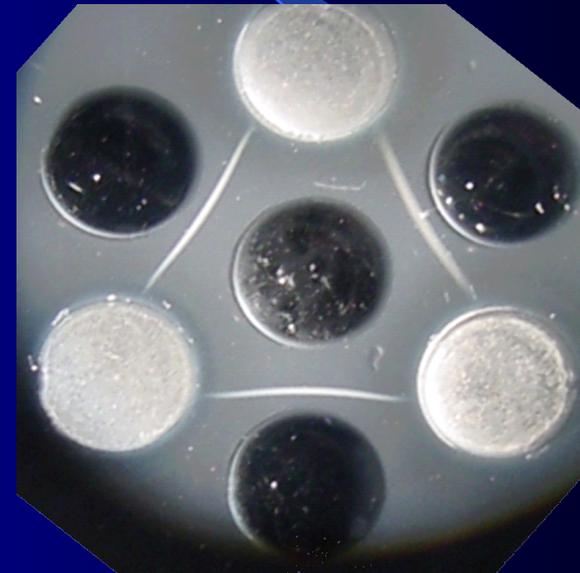
Immunodiffusione in gel di agar (AGID)

Reazione POSITIVA: con
alto titolo anticorpale



Linea di identità con
controllo POSITIVO

Reazione POSITIVA: con
basso titolo anticorpale



~50% dei laboratori
danno esito NEGATIVO

Immunodiffusione in gel di agar (AGID)

Vantaggi

- * Molto specifico
- * Validità ufficiale (anche a livello internazionale)
- * Lunga esperienza (~ 30 anni)
- * Costi ridotti

Limiti

- * Interpretazione soggettiva del risultato
- * Tempi lunghi (24\48 ore)
- * Falsi negativi (basso livello di anticorpi o errori nella lettura)

Immunodiffusione in gel di agar (AGID)

TEST DI COGGINS

- * PIASTRA
 - ø 90 mm

- * TERRENO
 - Doppio strato di Agar
 - I) 7 ml Agar 1,5%
 - II) 20 ml Agar 0,7%

- * STAMPO PUNZONE
 - ø pozzetti 7 mm
 - Distanza tra i pozzetti 3 mm

AGID metodo OIE

- * PIASTRA
 - ø 100 mm

- * TERRENO
 - Unico strato di Agar
 - I) 15-17 ml Agar 1 %

- * STAMPO PUNZONE
 - ø pozzetti 5,3 mm
 - Distanza tra i pozzetti 2,4 mm

Immunodiffusione in gel di agar (AGID)

OIE vs Coggins test

Vantaggi

- * Maggiore facilità di preparazione piastre agar (unico strato)
- * Maggiore facilità nella lettura (banda di reazione più chiara)
- * Quantità inferiore di reagenti per campione

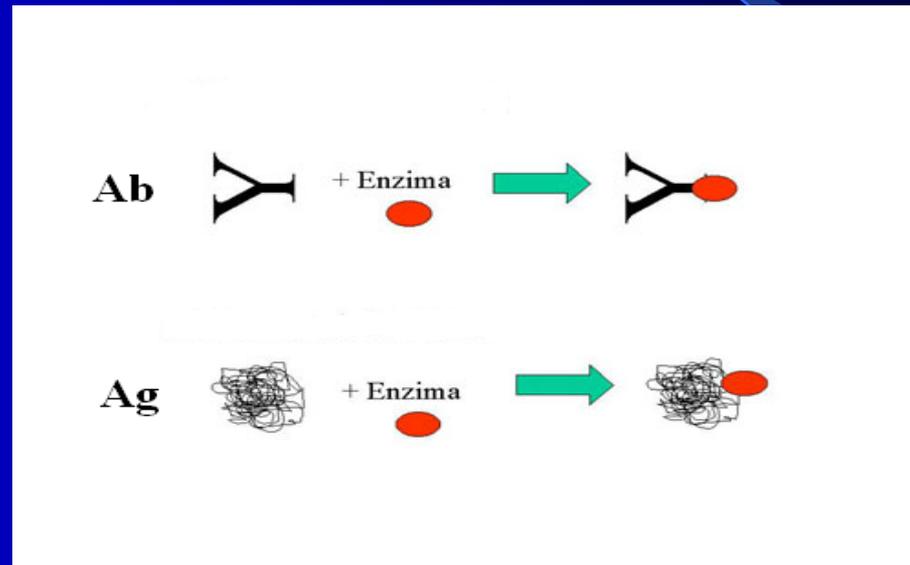
Limiti

- * Quantità dei reagenti (MR e agar) non standardizzate
- * Necessità di conferma positivi mediante tecnica AGID o IB



Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Principio: metodo immunoenzimatico



Ag o Ab legati ad un Enzima formano un Coniugato con attività:

- *immunologica*: formazione di un IC
- *enzimatica*: sviluppo di specifica colorazione

ELISA

Classificazione dei test esistenti

* CAMPO di APPLICAZIONE:

- *diretta* (ricerca e/o titolazione di Ag nei campioni biologici)
- *indiretta* (ricerca e/o titolazione di Ab specifici nel siero)

* NATURA del SISTEMA:

- competitiva
- non competitiva

* NATURA del CONIUGATO:

- Ag legato all'ENZIMA
- Ab legato all'ENZIMA

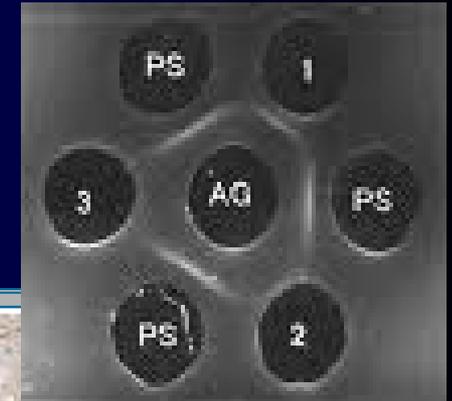
ELISA vs AGID

Vantaggi

- * Elevata sensibilità
- * Tempi ridotti
- * Lettura oggettiva dei risultati

Limiti

- * Falsi positivi
- * Necessità di conferma dei positivi in AGID o Immunoblotting
- * Costi per campione più elevati



ELISA di tipo non competitivo

* Impiego p26

- Equine Infectious Anemia Virus Antibody Test Kit,
Elisa VMRD, Inc

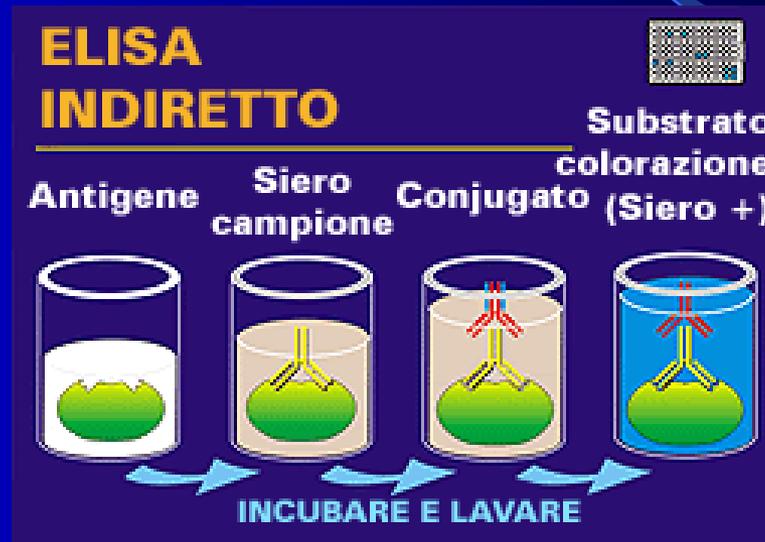
* Impiego p26 e gp45

- Synthetic Antigen Enzyme-Linked Immunoassay
(SA-ELISA) *Viral Antigens, Inc.*
- IDSCREEN Equine Infectious Anemia Indirect
ID.VET innovative diagnostic



ELISA di tipo non competitivo

Strategie impiegate



FASI del TEST

1. L'antigene è fissato alla fase solida
2. Si aggiunge il siero campione,
3. Poi il coniugato
4. Per ultimo, il substrato.
5. Segue la lettura del test (la colorazione indica positività).

ELISA di tipo competitivo

* Impiego p26

- Equine Infectious Anemia Virus Antibody Test Kit,
IDEXX LABORATOIRES

- "in house" CTB ELISA

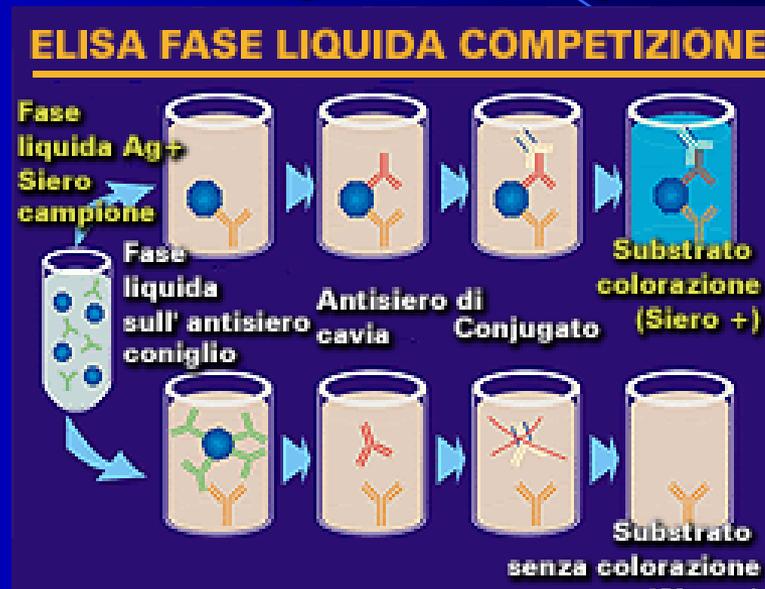
N.B. Il sistema di tipo competitivo consente di ridurre le reazioni

aspecifiche limitando il numero dei falsi positivi.



ELISA di tipo competitivo

Strategie impiegate



SIERO -

SIERO +

FASI del TEST

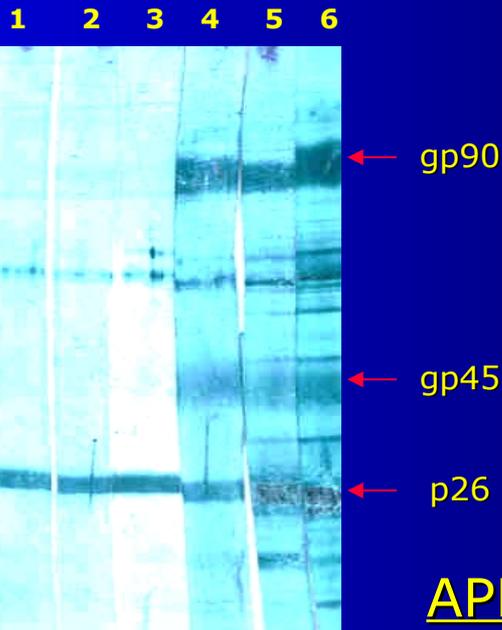
1. Si incuba il siero campione con l'Ag
2. Si dispensa la miscela nei pozzetti dove è stato fissato in precedenza un siero anti antigene
3. Si aggiunge il coniugato
4. Poi il substrato
5. Segue la lettura del test: l'assenza di colore indica positività.

Immunoblotting

RIFERIMENTI NORMATIVI

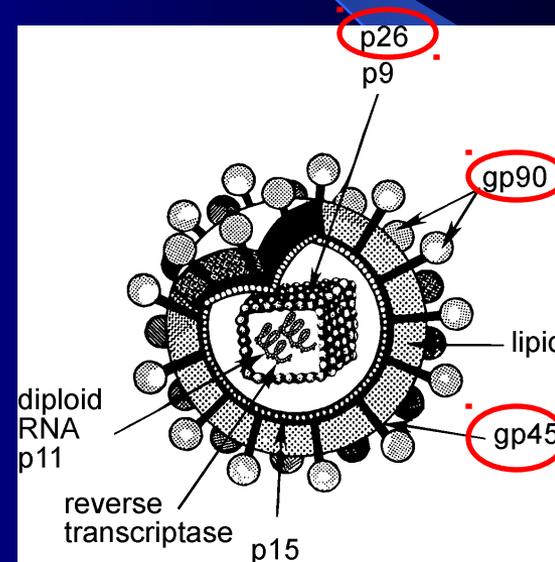
→ *Manuale OIE 2008 (VI Ed.)*

→ *Nota Min. Sal. 12 Marzo 2007*



Samples 1-3
NEG for EIA
(POS for p26)

Samples 5, 6
POS for EIA
(≥ 2 proteins)



APPLICAZIONI

→ *Conferma dei POSITIVI in ELISA*

→ *Esame campioni con esito discordante ELISA/AGID*

Immunoblotting

Principio: basato su una reazione immunologica tra gli anticorpi eventualmente presenti nel siero e le singole proteine del virus purificato, separate e adsorbite su una sottile striscia di nitrocellulosa

a. Gli antigeni virali sono separati tra loro in base al peso molecolare e sono adsorbiti sulla membrana.

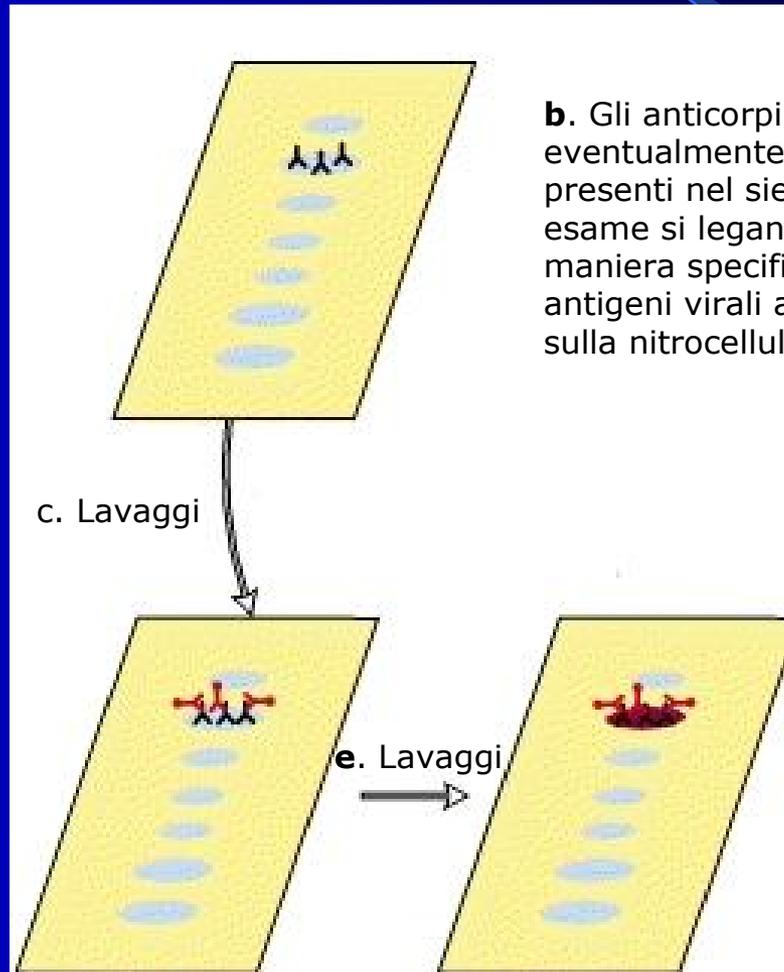
b. Gli anticorpi specifici eventualmente presenti nel siero in esame si legano in maniera specifica agli antigeni virali adsorbiti sulla nitrocellulosa.

c. Lavaggi

d. L'anticorpo secondario coniugato ad enzima si lega agli anticorpi equini rimasti legati agli antigeni virali adesi alla membrana.

e. Lavaggi

f. Con l'aggiunta del substrato cromogeno specifico per l'enzima coniugato all'anticorpo secondario, in corrispondenza del legame sulla membrana di nitrocellulosa si svilupperà una colorazione visibile.



Immunoblotting

Vantaggi

- * Test altamente specifico e sensibile
(Rileva tutte e tre le proteine specifiche del virus dell'AIE)
- * Validità ufficiale (anche a livello internazionale)
- è riconosciuto come test di conferma
- * Tempi ridotti (6-8h)
- * Nessuna possibilità di falsi positivi/negativi

Limiti

- * Test lungo e laborioso
- * Discreta difficoltà di esecuzione
- * Richiede una buona esperienza sia nell'esecuzione che nella lettura
- * Non ancora validato



Iter diagnostico ottimale

- * ELISA primo test: più sensibile e oggettivo
- * Conferma mediante AGID (previsto): più specifico
- * Campioni con esito discordante testati in Immunoblotting

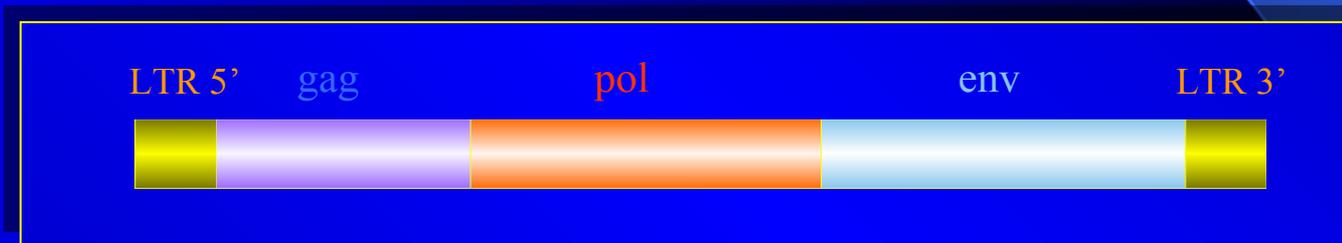
Iter diagnostico seguito dal CRAIE

1. Tutti i campioni pervenuti per conferma di positività sono testati in AGID (Coggins e OIE) ed ELISA CBT "in house" prodotto e distribuito da IZSLT
2. In caso di esito discordante tra AGID ed ELISA si esegue un ulteriore test ELISA con kit commerciale ed Immunoblotting
3. In caso di esito discordante tra i nostri esami e quelli eseguiti presso il laboratorio di prima istanza si procede come al punto 2.



*Diagnosi di laboratorio:
applicazione di tecniche biomolecolari
per la diagnosi diretta di AIE*

Nell'ambito di due Ricerche correnti sono stati messi a punto TEST MOLECOLARI per la ricerca di EIAV (sia per DNA che per RNA virale).



I saggi molecolari sono stati sviluppati sul gene *gag*, regione del genoma di EIAV altamente conservata (codificante per la proteina p26).

*Diagnosi di laboratorio:
applicazione di tecniche biomolecolari
per la diagnosi diretta di AIE*

DNA provirale:

TESSUTI linfoidi
(milza/linfonodo meseraico)

SANGUE in EDTA
(leucociti sangue periferico)

- Estrazione DNA protocollo *fenolo-cloroformio*

- Centrifugazione a 2500 *g* x 10' e separazione "buffy coat"
- Estrazione DNA
 - Protocollo *fenolo-cloroformio*
 - Kit "QIAamp DNA Blood Mini Kit"

- Corsa elettroforetica su gel di agarosio 1%
- Lettura assorbanza a 260 nm
- PCR per TNF
- Nested -PCR per AIE

*Diagnosi di laboratorio:
applicazione di tecniche biomolecolari
per la diagnosi diretta di AIE*

Nested-PCR

Il saggio riesce a svelare fino a 10 copie di DNA plasmidico
(Il DNA genomico non interferisce nella reazione con il DNA virale)

- Tessuti Solo in un caso (milza) è stato possibile svelare la presenza del virus
- Sangue Il DNA estratto, quasi sempre amplificabile mediante PCR per TNF, in nested-PCR non ha rivelato la presenza di virus nei campioni analizzati



Ipotesi: presenza di un n° molto basso di copie di genoma provirale nel campione (fase cronica dell'infezione)

*Diagnosi di laboratorio:
applicazione di tecniche biomolecolari
per la diagnosi diretta di AIE*

RNA virale: SANGUE in EDTA
(*Plasma*)

- Centrifugazione a 2500 *g* x 10' e separazione *plasma* (2 ml)
- Centrifugazione e concentrazione del campione
- Precipitazione delle proteine (5000 *g* x 15' 4°C)
- Concentrazione dell'RNA virale (28000 *g* x 2h 4°C)
- Estrazione RNA - Kit "QIAamp RNA Viral Mini Kit"
- RT-Nested-PCR per AIE

Diagnosi di laboratorio: applicazione di tecniche biomolecolari per la diagnosi diretta di AIE

- RT -Nested-PCR

Il saggio riesce a svelare fino a 100 copie di RNA trascritto dal DNA plasmidico (sensibilità ok)

Plasma: solo in un numero limitato di casi è stato possibile svelare la presenza del virus nel campione



Ipotesi: presenza di un n° molto basso di copie di genoma provirale nel campione (fase cronica dell'infezione)

Diagnosi di laboratorio: applicazione di tecniche biomolecolari per la diagnosi diretta di AIE

Obiettivi del Centro di Referenza per l'AIE:

- Verificare la sensibilità dei saggi molecolari esistenti (fase cronica)
- Validare il test su campioni di animali in fase acuta (diagnosi rapida)
- Ottimizzare e standardizzare il saggio Real-Time TaqMan PCR per la diagnosi diretta quantitativa di Anemia infettiva equina
- Sviluppare un protocollo di amplificazione e sequenziamento di *env* (*Epidemiologia molecolare*)

.....Grazie per l'attenzione!!!

