

La diagnostica molecolare presso la D. O. Diagnosi delle Malattie Virali e delle Leptosirosi

Giuseppe Manna

Firenze 15 dicembre 2011



Settori di attività

- CeRME
- CRAIE
- Attività istituzionale
- Sorveglianza di malattie virali
- Rabbia



CeRME

Diagnosi differenziale per la ricerca degli agenti eziologici nelle:

- Sindromi respiratorie – ricerca del virus dell'AVE, di EHV tipo 1 e 4, del virus dell'Influenza Equina.
- Sindromi riproduttive – ricerca del virus dell'AVE e degli EHV tipo 1 e 4.
- Sindromi neurologiche – ricerca del virus della WN, degli EHV tipo 1 e 4, del Bornavirus.



CeRME (2)

Diagnosi per:

- Babesia caballi
- Theileria equi
- Peste Equina Africana



CRAIE

Conferma virologica dei casi di Anemia
Infettiva Equina:

- PCR classica seminested
- Amplificazione e sequenziamento per individuare il ceppo e le connessioni epidemiologiche (a cura di Biotecnologie)



Attività istituzionale

(diagnosi di malattie, virali e non, di interesse veterinario)

1. Alphaherpesvirus dei ruminanti (BHV-1 e 5, BuHV-1)
2. BVD
3. PSC
4. PSA
5. Leptospire patogene
6. FCM
7. CanCV (in allestimento)



Sorveglianza

- Influenza Aviare
- West Nile Disease e virus correlati
- Newcastle Disease
- Blue Tongue



Rabbia

- I **virus della rabbia** sono a singolo filamento di RNA a polarità negativa, provvisti di envelope, appartenenti al genere *Lyssavirus*.
- Sono classificati in 7 genotipi in base alla sequenza nucleotidica e aminoacidica della nucleoproteina (N).
- Tutti neuropatogeni e mortali per l'uomo tranne il genotipo 2
- Il genotipo 1, che si ritrova in tutto il mondo, e il genotipo 5 e 6, sono quelli che si ritrovano in Europa



Ricerca dei virus della Rabbia

- SYBR GREEN Real Time PCR per la ricerca dei virus della Rabbia (genotipo 1) e degli European bat lyssaviruses 1 e 2 (genotipi 5 e 6)
- I primer sono disegnati sulla nucleoproteina del capsido (N)
- Nella metodica non si usano sonde Taqman, nel caso di positività si formano doppi filamenti di DNA che vengono resi fluorescenti dall'intercalarsi del SYBR GREEN.
- La PCR è stata introdotta per affiancare la diagnosi con le colture cellulari, che sostituisce la vecchia metodica che prevedeva l'inoculazione dei topi da laboratorio.

Non sostituisce l'immunofluorescenza.



Leptospire

- ***Leptospira*** (dalla parola greca *leptos*, "sottile", e la parola latina *spira*, "spira")
- Hanno forma di filamento elicoidale ad estremità uncinata e posseggono 2 flagelli che le rendono mobili.
- Vengono suddivise in tre categorie: patogeniche, intermedie, saprofitiche.
- Il genere è diviso, su base genetica, in 20 specie e in circa 200 sierotipi.
- Erano conosciute in Cina fin dai tempi antichi. Si pensa che siano state introdotte in Europa occidentale con l'invasione dei ratti dall'Asia.
- Nel 1917 studiosi giapponesi le identificarono come fonte di un'infezione con ittero e danni vascolari, determinarono le modalità della trasmissione (il ruolo del ratto), la patogenesi, il quadro clinico, le metodiche di diagnosi e il trattamento della malattia.
- Le leptospire dopo la prima infezione si localizzano nei tubuli renali e possono essere escreti nell'ambiente con le urine, per anni, anche senza dare segni di malattia.



Ricerca di leptospire patogene (da urine, sangue, organi)

- Riferimento bibliografico: Ahmed A, Engelberts MF et al. "Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical materials" PLoS ONE, September 2009, Volume 4 Issue 9 e7093 pagg. 1-8
- Un metodo SYBR Green Real Time PCR specifico per le leptospire patogene, messo a punto su campioni di sangue e su biopsie renali di pazienti affetti da leptospirosi.
- I primer sono stati disegnati sul gene secY molto adatto alla diagnosi molecolare delle leptospire e alla loro classificazione filogenetica (la PCR rileva solo le sierovarianti classificate come patogene).
- Abbiamo testato il metodo sulle urine per verificare che non vi fosse inibizione della PCR usando diluizioni scalari di colture di leptospire patogene (10 sierovarianti: Hj, Ict, Cop, Can, Po, Gt, Ta, Br, Sx, Ba) in concentrazioni diverse di urina: la PCR non è stata significativamente inibita.



Manipolazione dei campioni per la PCR

- La rigorosa applicazione delle corrette modalità di prelievo, trasporto, trattamento e conservazione del campione è condizione preliminare ed essenziale per garantire l'attendibilità dei risultati ottenuti con le tecniche di biologia molecolare.
- Percorso pre-analitico del campione
 - prelievo
 - trasporto
 - conservazione (temperatura, tempo)



Prelievo dei campioni

- Recipienti sterili (possibilmente monouso) ben identificati e ben chiusi
- Resistenti alle condizioni di trasporto senza disperdere il contenuto. Non possono essere le piastre Petri!
- Se si tratta di tamponi, immergerli subito nel terreno di trasporto (PBS + Glicerolo + antibiotici)
- Se è necessario fare dei pool, sono preferibili quelli per soggetto. Descrivere esattamente la composizione del pool



Trasporto dei campioni

Gli acidi nucleici, soprattutto l'RNA sono molto labili

- Porre immediatamente alla temperatura di conservazione prevista:

+ 4° C per il sangue con anticoagulante

-20° C per tutti gli altri campioni

Evitare di congelare e scongelare

Inviare il più presto possibile al laboratorio di biologia molecolare



Scelta delle matrici per la PCR

Per la ricerca virologica e soprattutto per la PCR vi sono delle matrici più idonee alla diagnosi:

Es.:

Tamponi cloacali **meglio** dei tamponi faringei per l'Influenza Aviaria

Tamponi faringei **meglio** di quelli cloacali per la West Nile Disease

West Nile:

cuore, rene, milza, encefalo negli uccelli

Encefalo e midollo spinale nei cavalli

Leptospire

Le sole urine o i soli reni non bastano per la diagnosi di leptospirosi (anche sangue o altri organi come fegato, milza)

EHV-1 e EHV-4, FCM

La positività nel sangue può essere dovuta alla latenza virale nei leucociti.

La viremia viene correttamente diagnosticata mediante tamponi



Grazie per l'attenzione

