

Aggiornamento sulle lentivirusi dei piccoli ruminanti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana
Via Castelpulci, 43 - 50018 - Scandicci (FI)

Strategie diagnostiche in funzione della variabilità genetica

Maurizio Mazzei

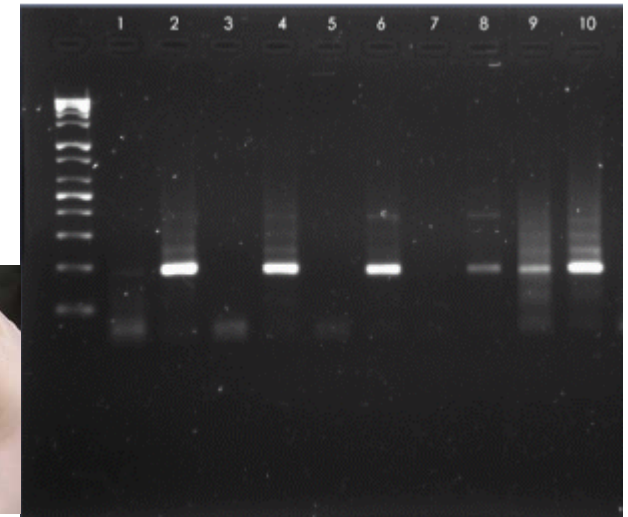
Dipartimento di Patologia Animale

Università di Pisa

Diagnosi SRLV

Non essendo attualmente a disposizioni terapie o vaccini efficaci, i piani di controllo ed eradicazione si basano su esami diagnostici in grado di identificare animali infetti.

Numerose tecniche diagnostiche dirette o indirette sono descritte con diversi valori di sensibilità e specificità.



Bibliografia

Veterinary Microbiology 107 (2005) 49–62

Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses

D. de Andrés^a, D. Klein^b, N.J. Watt^c, E. Berriatua^d,
S. Torsteinsdottir^c, B.A. Blacklaws^f, G.D. Harkiss^{c,*}

Veterinary Microbiology 142 (2010) 193–198

Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing

J.M.A. Brinkhof^{a,*}, D.J. Houwers^c, L. Moll^b, D. Dercksen^b, C. van Maanen^a

J Vet Diagn Invest 22:843–855 (2010)

Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses

Lynn M. Herrmann-Hoesing¹



Diagnosi indiretta SRLV ELISA

La tecnica ELISA è adatta ad analizzare un ampio numero di campioni grazie alla facile standardizzazione; molto versatile e in grado di utilizzare una ampia possibilità di scelta tra diverse tipologie di antigeni.



Diagnosi diretta SRLV PCR

La PCR offre il vantaggio, rispetto alla sierologia, di identificare gli animali infetti prima della siero conversione o animali con titoli anticorpali insufficienti; tuttavia a causa dell'eterogeneità delle sequenze genomiche degli stipiti virali esistenti, la realizzazione di un protocollo di PCR rende necessario la scelta di primers specifici per i diversi stipiti circolanti e mal si adatta a screening di massa per i costi elevati

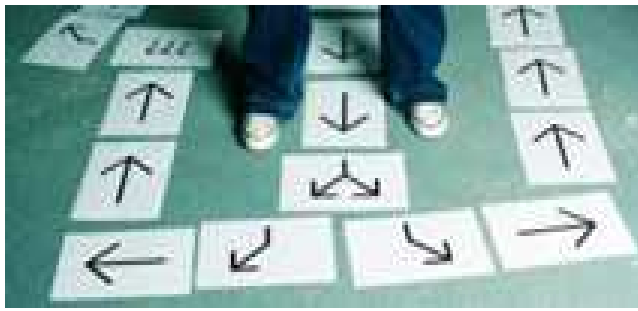
```
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230
ACAGCACATCTTAACCTGAGCGGGGTCGTTTCAGGTGAAAACGGTTTAACCA-ACCGCTACGAATACAGCCTGATAGGGTGCTGCAGAGGCCCACTGTATTGCTACTAA
...G..A..A...C..T...GT...CA...AG-...A...A...G...
...C...
...G...
...GA...CC...A...G..A...-...T..T..T..G..C...
...T...C...G...CG.GTAG-...T..T...G...A..A..
...T...C...G...CG.GTAG-...T..T...G...A..A..
...T...C...G...CG.GTAG-...T..T...G...A..A..
...AGA...T...A...G...-...G...G...
...T...C...G...CG.GTAG-...T..T...G...A..A..
...C.G...G...-...C...
...T...C...G...CG.GTAG-...T...G...A..A..
...G...G...-...G...
...G...C..G...GT...A..TAG-...AT...G...G..C..
...G...CC.T...G...-A..AA--...T..T..TG...G..C..
...GA...CC...A...G..A...-...T..T..T..G..C...
...T...G..G..
```

Diagnosi SRLV

- Dalla letteratura sono descritti più di trenta saggi ELISA commerciali per l'identificazione di SRLV e un ampio numero di saggi di PCR, RT-PCR e real time PCR...

ma non esiste un gold standard





La scelta del test da impiegare si basa sull'analisi di fattori tra cui:

Quale fine diagnostico, numero di campioni da testare, disponibilità di tempo e costi

La percentuale di identità tra gli antigeni/sequenze utilizzate per generare i vari kit e lo stipite virale circolante

- Conosco il virus? È caratterizzato filogeneticamente?

Quale test ho a disposizione?

Programmi controllo

Diversi paesi/regioni hanno intrapreso programmi di controllo ed eradicazione degli SRLV

Il primo paese europeo a iniziare il controllo a livello nazionale per SRLV è stata l'Olanda (1980), successivamente con diverse modalità Francia, Italia, Germania, Spagna, Finlandia e Svizzera.



Programmi controllo

In Svizzera il programma iniziato nel 1984 per il controllo CAEV, ha ridotto la sieroprevalenza da 80-60% al 1-5% in circa 10 anni utilizzando kit ELISA

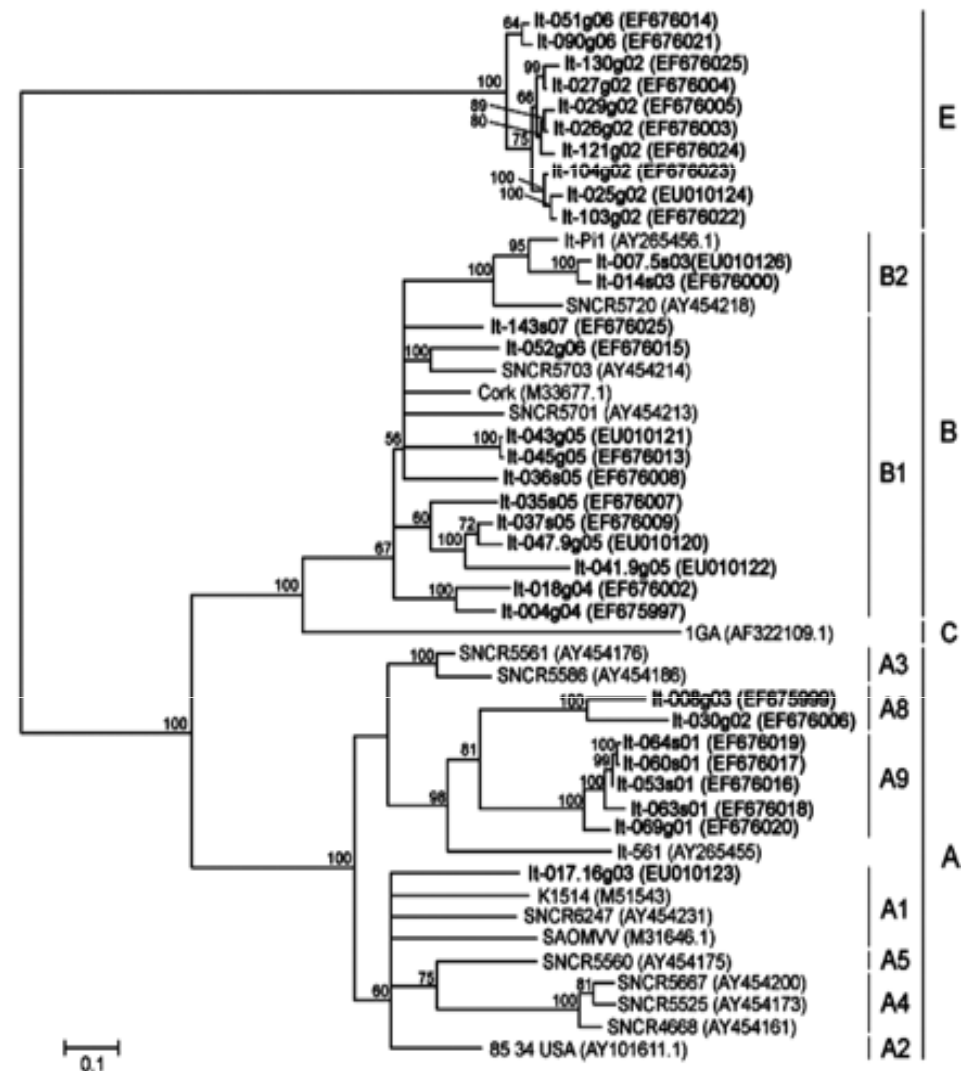
CHEKIT CAEV/MVV Screening (IDEXX)

Test conferma Western blot



Programmi controllo sierologia

Strumento molto efficace in situazioni di alta sieroprevalenza ma cosa succede nelle situazioni a bassa sieroprevalenza o in aree dove possono circolare stipiti antigeneticamente diversi da quelli su cui sono basati i classici test ?



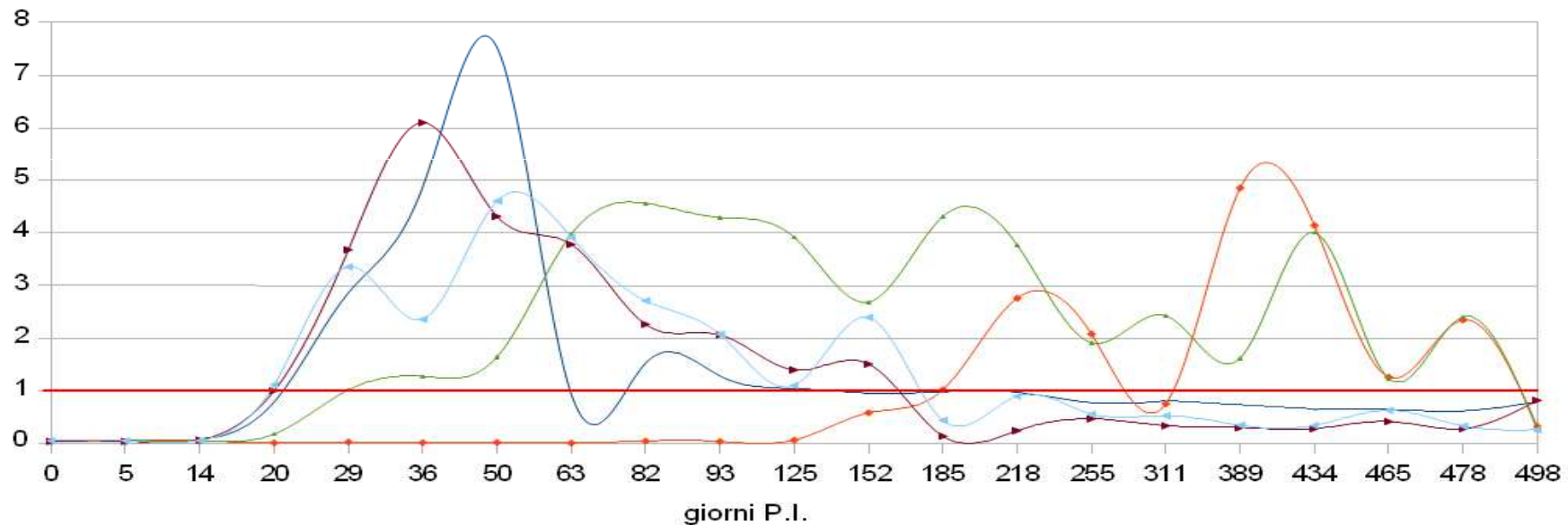
Sierologia

Maggiori problemi nella diagnosi sierologica di
SRLV:

bassi e fluttuanti titoli anticorpali

lenta sieroconversione

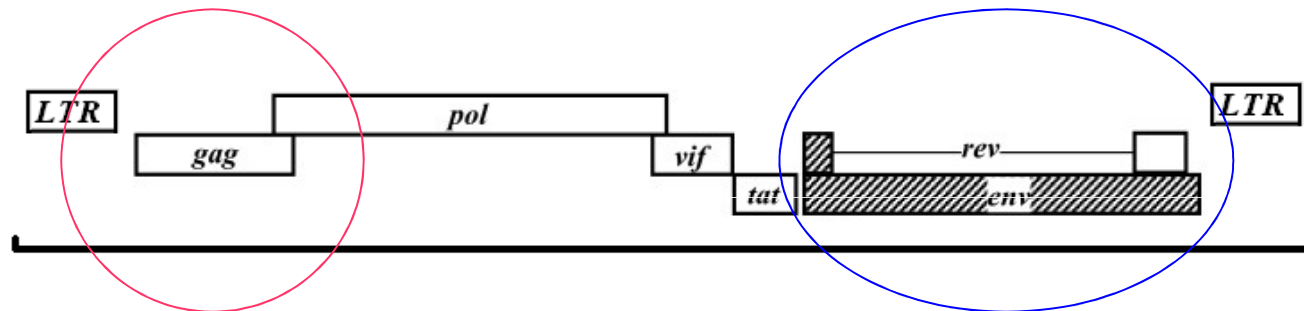
variabilità antigenica



Genoma virale

Gag gene più conservato (ma non abbastanza)

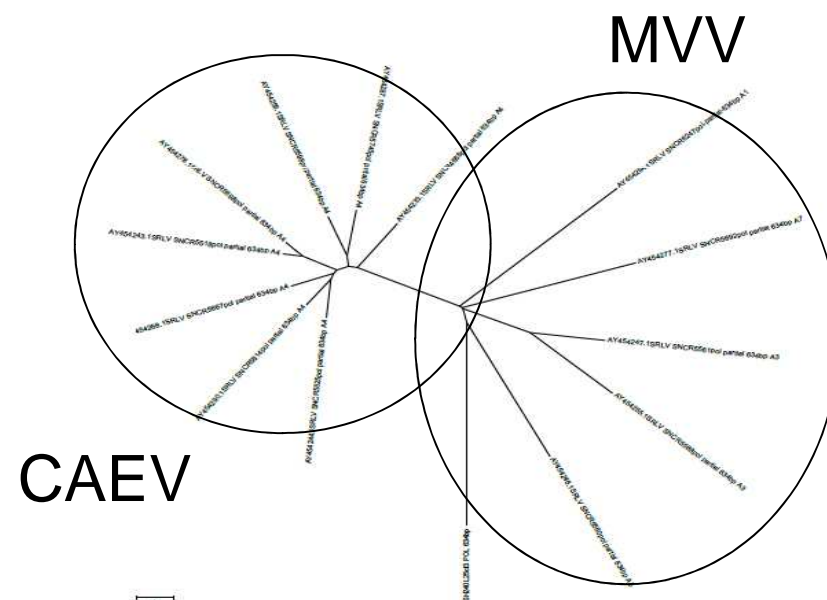
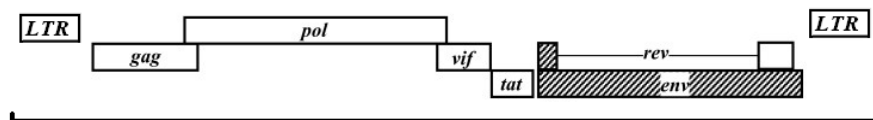
Env gene molto variabile, ma capace di evocare una forte risposta immunitaria e una rapida sierconversione (6 sett)



Tipologia antigene

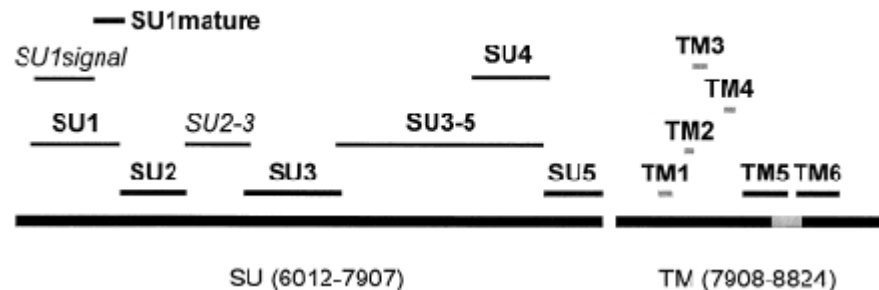
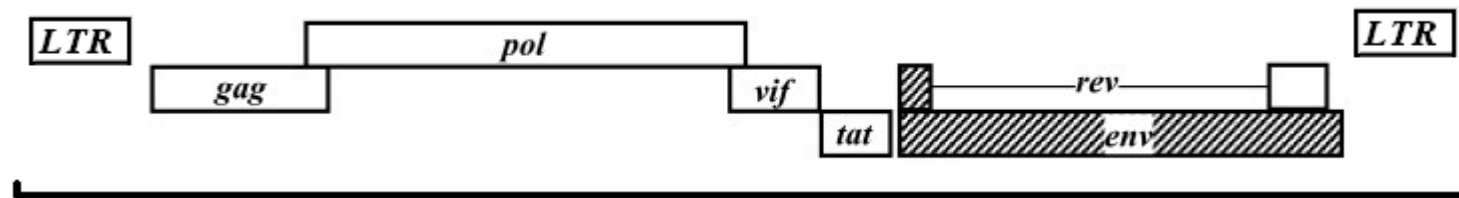
Negli ultimi anni in Italia test sierologici basati su antigeni *gag* derivati da ceppi italiani appartenenti ad entrambi i gruppi A (MVV) e B (CAEV) sono stati sviluppati ed applicati in condizioni di campo:

risposta in gran parte tipo-specifica, da cui la necessità di utilizzare gli antigeni rappresentativi di entrambi i genotipi per migliorare la sensibilità dei test diagnostici.



Tipologia antigene

Analoghi risultati sono stati ottenuti utilizzando antigeni basati su sequenze env (SU5) (maggior reattività stipite specifica) strumento utile per la sierotipizzazione

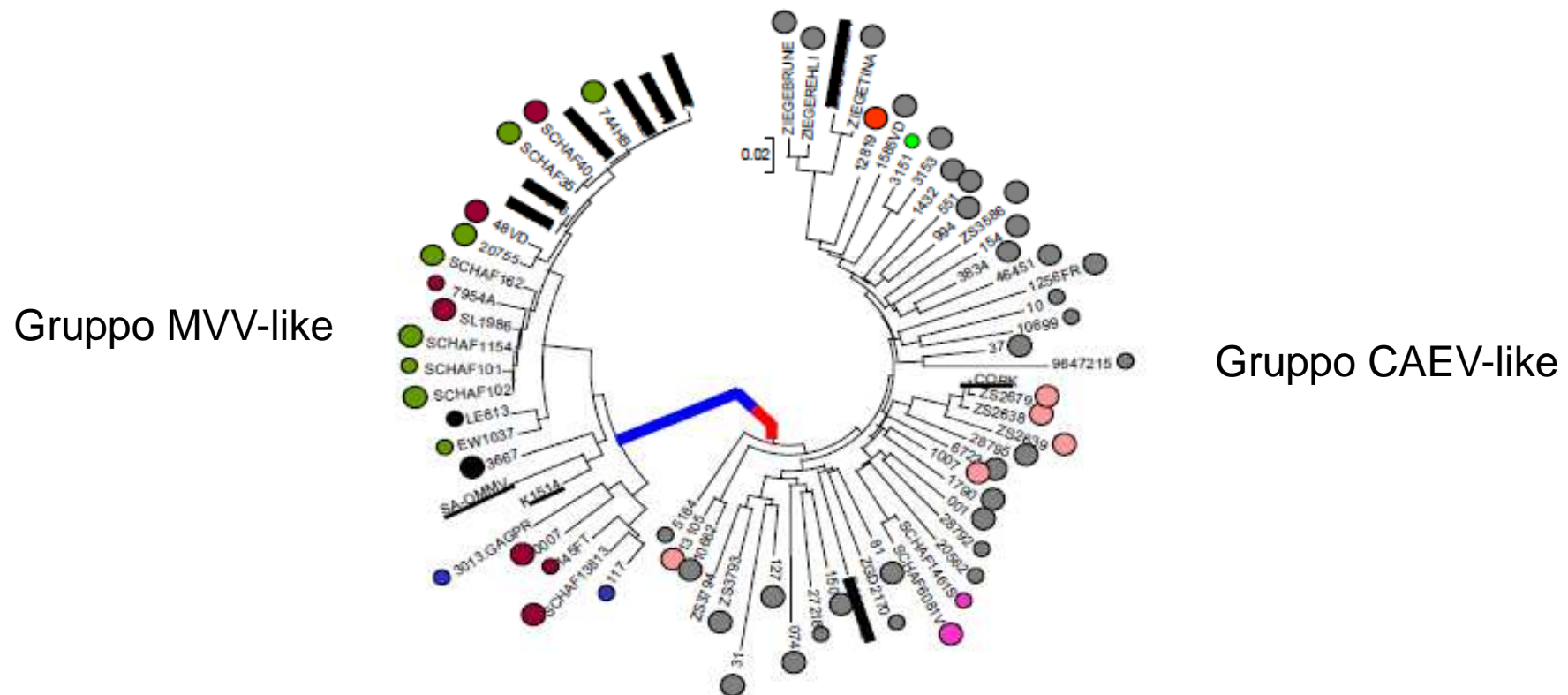


Analysis of the Antibody Response to an Immunodominant Epitope of the Envelope Glycoprotein of a Lentivirus and Its Diagnostic Potential

Franca Mordasini, Hans-Rudolf Vogt, Marie-Luise Zahno, Ariane Maeschli, Chiara Nenci,
Reto Zanon, Ernst Peterhans, and Giuseppe Bertoni*

Institute of Veterinary Virology, CH-3012 Bern, Switzerland

Studio svizzero ha analizzato filogeneticamente
sequenze di SRLV circolanti in Svizzera, che
correlano a specifiche reattività peptide-ELISA



Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses

E. Grego^a, L. Bertolotti^a, M.L. Carrozza^c, M. Profiti^a,
M. Mazzei^b, F. Tolari^b, S. Rosati^{a,*}

Short communication

Veterinary Microbiology 137 (2009) 369–374

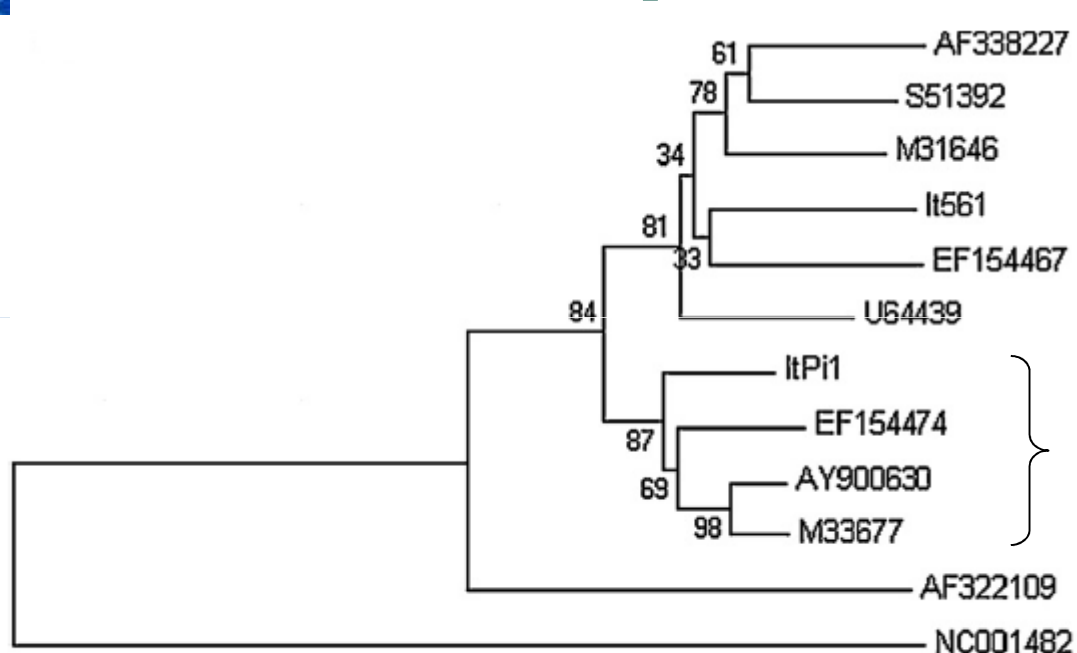
Seroconversion against SU5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different SRLV genotypes

M.L. Carrozza^a, M. Mazzei^{b,*}, D. Lacerenza^c, L. Del Chiaro^b, M. Giammarioli^d,
C. Marini^d, D. Rutili^d, S. Rosati^c, F. Tolari^b



- Studio italiano: 2 isolati it-561 (A) e It-Pi1 (B) sono stati sequenziati nella regione *env* e i relativi peptidi SU5 sono stati sintetizzati
 - I peptidi si sono dimostrati altamente reattivi e specifici per i due stipiti:
 - Buona discriminazione genetica
- ⇕
- Necessità di un corredo più ampio

Sequenze aa di SU5



MVV - like

CAEV - like

0.1

It-561
EF154467
U64439
S51392
M31646
AF338227
It-Pi1
EF154474
M33677
AY900630

.....
5	15	25
KVRAYTYGVV	EMPSNYEQKD	RKKRD
R..T.....	D..T..VELQ	.GR.K
.....	...KS.MESQ	KR.KR
R.....E.	D..QS.LE.N	.RNAF
.....	D..KA.RE.N	MRNKR
.....	...QS.MEER	GEN.R
R.....I	D..K...KTN	LNRKK
R.....MI	.L.K...KIS	LNR.K
.....I	...E..AKTR	IIN.K
.....I	...E..AKTR	IIN.R

Applicazione screening ELISA su popolazione ovi caprina giordana

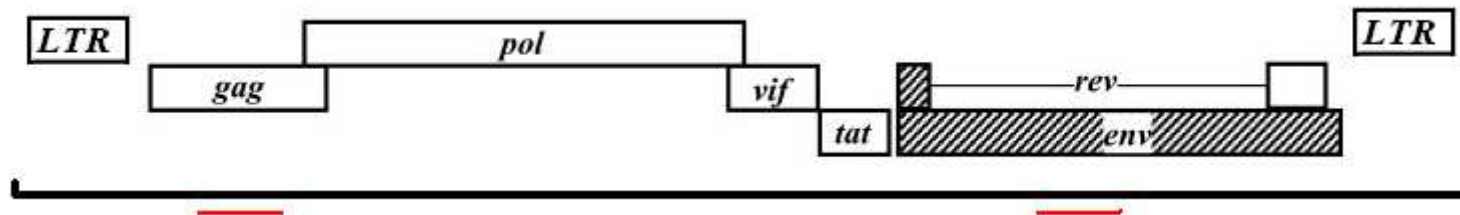


Applicazione test sierologici

Impiegate tre tipologie kit ELISA

A) ELITEST-VMV /CAEV_(Hyphen BioMed) kit commerciale

Antigene: combinazione proteina ricombinante p25 (gag) e un peptide sintetico corrispondente alla regione immunodominante della proteina transmembrana gp46 (env) (antigeni basati su stipite MVV - EV-1)



Applicazione test sierologici

Impiegate tre tipologie kit ELISA

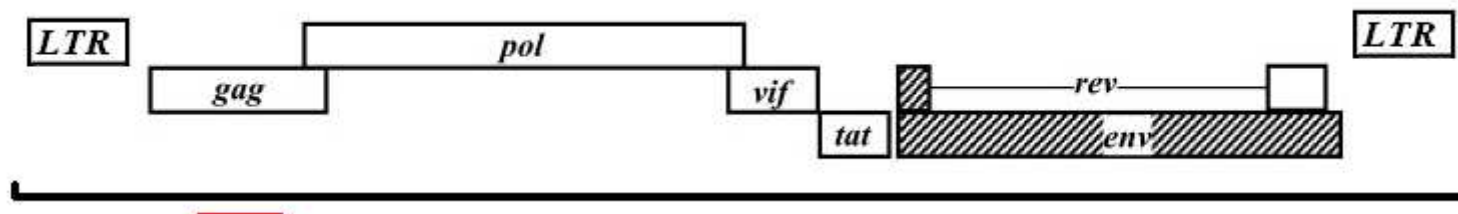
Veterinary Immunology and Immunopathology 112 (2006) 264–271

Antibody response in sheep experimentally infected with
different small ruminant lentivirus genotypes

Daniela Lacerenza^a, Monica Giammarioli^b, Elena Grego^a, Carla Marini^b,
Margherita Profiti^a, Domenico Rutili^b, Sergio Rosati^{a,*}

B) p16-p25 ELISA

Antigene basato sulla proteina ricombinante p16/p25 (gag) ottenuta da due
isolati italiani rappresentativi di MVV It-561 (A3) e CAEV It-Pi1 (B2)



Applicazione test sierologici

Impiegati tre tipologie kit ELISA

Short communication

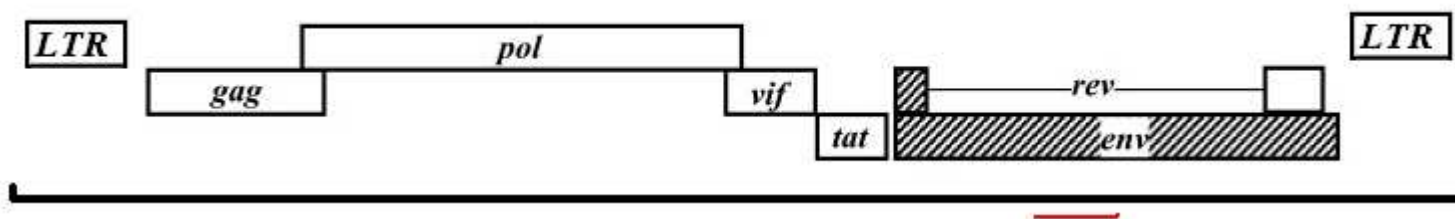
Veterinary Microbiology 137 (2009) 369–374

Seroconversion against SU5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different SRLV genotypes

M.L. Carrozza^a, M. Mazzei^{b,*}, D. Lacerenza^c, L. Del Chiaro^b, M. Giammarioli^d,
C. Marini^d, D. Rutili^d, S. Rosati^c, F. Tolari^b

C) SU5 peptide ELISA

Antigene basato su peptidi sintetici (25aa) disegnati sul dominio SU5 della proteina dell'envelope di stipiti italiani (It-561; It-Pi1).

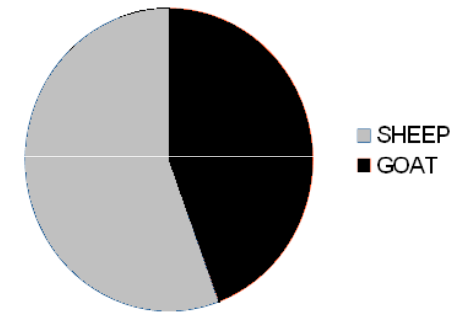




Animali

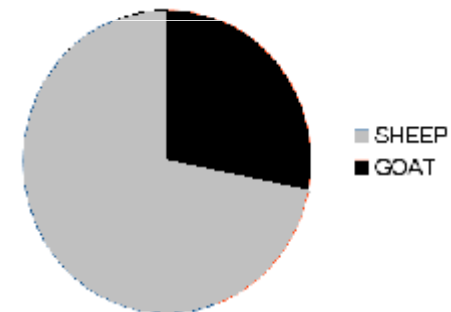


Esaminati 543 sieri di 30 greggi;
– 302 pecore e 241 capre



Animali sieropositivi sono stati identificati in 18 greggi (9 greggi ovini, 2 caprini e 7 misti)

In totale 114 sieri positivi
(82 pecore e 32 capre)



Risultati sierologici

I test utilizzati:

A) ELITEST:	72/543
B) P16/25(MVV+CAEV):	81/543
C) SU5 (MVV + CAEV):	26/543

I campioni identificati dai diversi test non sono completamente sovrapponibili

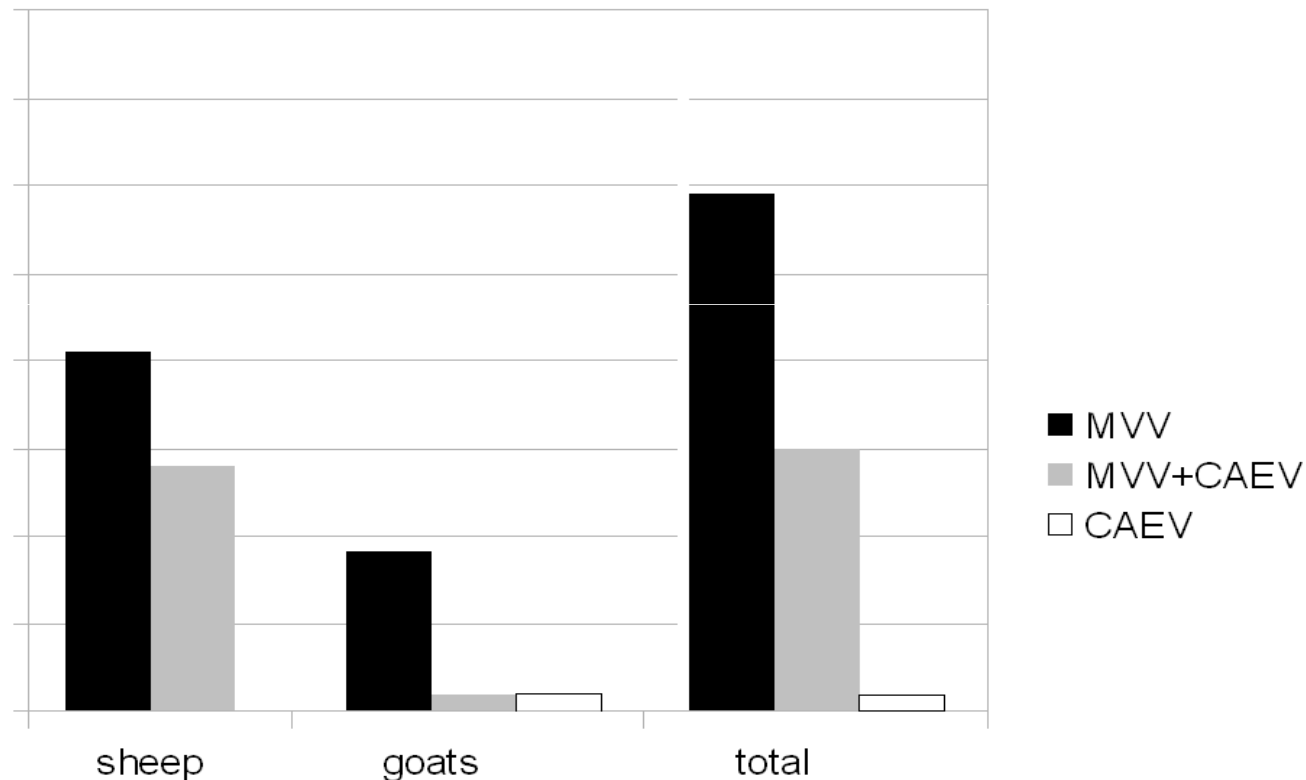
Reattività siero verso antigeni MVV-like o CAEV-like



63% sieri hanno reagito solo verso antigeni MVV (60% pecore 78% capre)
 32% hanno reagito sia verso CAEV che MVV (40% pecore e 8% capre)
 5% sieri hanno reagito solo verso CAEV (nessuna pecora 14% capre)

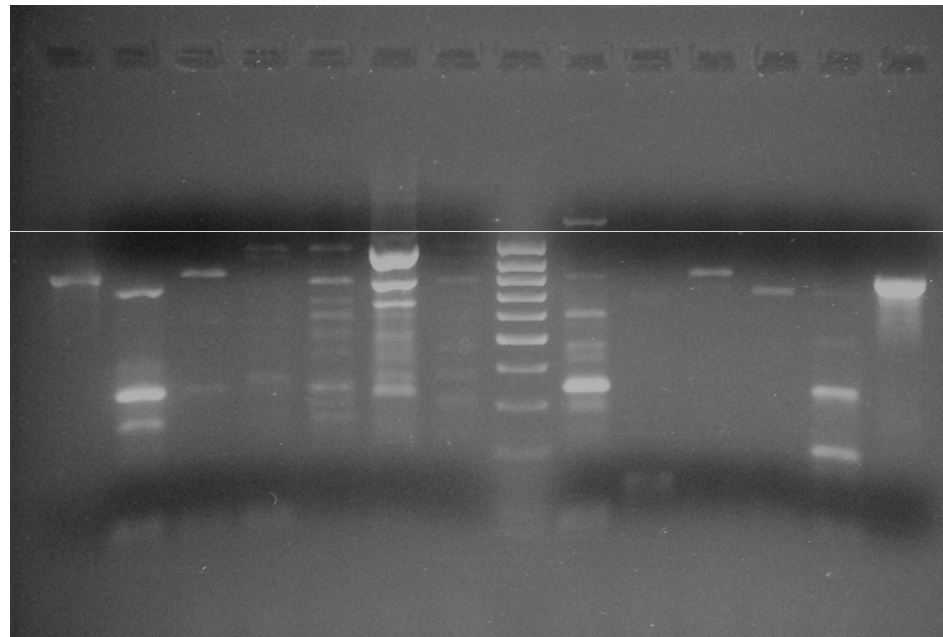
Sierotipizzazione

I risultati dei test (in grado di sierotipizzare) dimostrano che la maggior parte dei sieri presenta reattività diretta verso antigeni MVV-like



Studio del genoma

Sono stati applicati, su DNA estratto da buffy coat, diversi protocolli di nested-PCR al fine di amplificare e sequenziare porzioni di genoma virale (gag-pol-env)



Studio del genoma

Allineamento tra
sequenze
giordane e stipiti
utilizzati nei test
ELISA per le 3
regioni
immunodominanti
gag p16-25

	10	% identità
	
Jordan_gag	KELTP E ETSKREFASL	
EV1-gag	.Q.....	93.7
It-561 MVV like	.N.....	93.7
It Pi1 CAEV like	.L.....SN.KD.M..	62.5

	10	
	
Jordan_gag	KLNEEAERWVRQNP P GP N	
EV1-gag	100
It-561 MVV like	..D.....	94
It Pi1 CAEV likeR.N...P.A	77.8

	10	
	
Jordan_gag	VQQATV E EKM Q ACRDVGS D	
EV1-gag	...S...CK...M...E	73.7
It-561 MVV likeN.....N...E	84.2
It Pi1 CAEV like	...S...O.....E	84.2

Conclusioni

I risultati delle analisi genetiche confermano quanto osservato dalle analisi sierologiche (giusta sierotipizzazione)

- Bassa reattività verso antigeni CAEV
- Predominanza di reattività verso antigeni MVV-like anche in capre

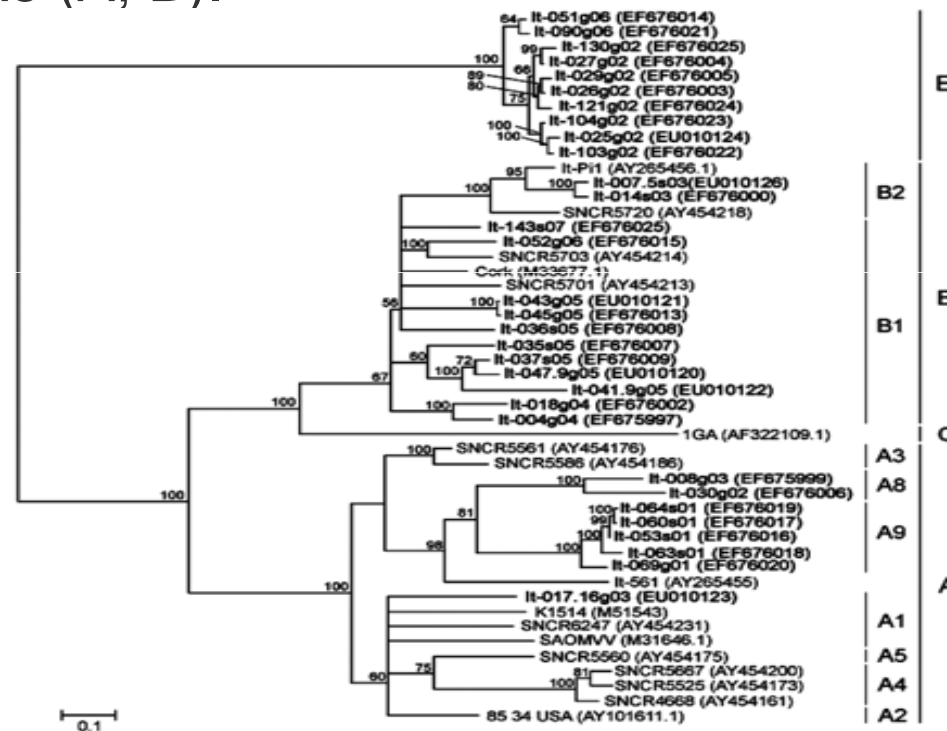
La bassa reattività del peptide ELISA (gene env SU5) è in accordo con l'alta variabilità del gene *env* dimostrando:

- elevata sensibilità specie specifica
- necessità di impiego di un pannello di peptidi derivati dallo studio di sequenze virali circolanti in una determinata area

Conclusioni

La performance dei test disponibili è in funzione della omologia con gli stipiti virali circolanti in una data area geografica.

In un piano di controllo inizialmente è consigliabile utilizzare combinazioni di kit ELISA basati su antigeni rappresentativi di stipiti MVV e CAEV like (A; B).



Conclusioni

Nelle fasi finali di un piano di eradicazione potrebbe essere utile l'impiego di kit diagnostici il cui antigene è rappresentativo degli stipiti circolanti nell'area di studio evitando la possibile selezione di animali escape-mutant

