



# **"Il Papilloma virus felino e le neoplasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici"**

**Roma, 29 Novembre 2019**

**Ruolo e attività di ricerca del Centro di Referenza  
Nazionale per l'Oncologia Veterinaria e Comparata  
(CEROVEC)**

***Dott.ssa Paola Modesto***

***Dott.ssa Elisabetta Razzuoli***



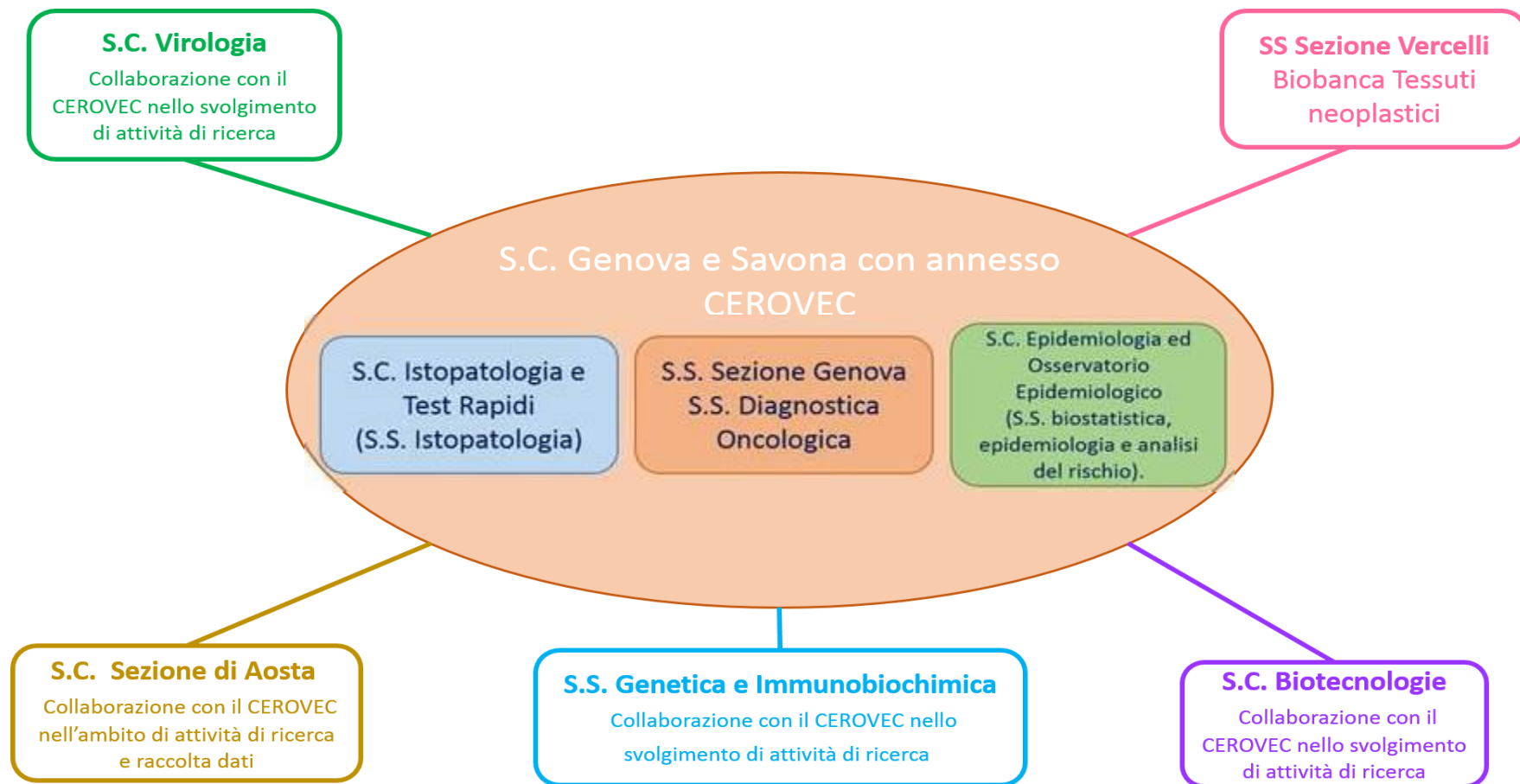
## Compiti peculiari del CEROVEC

1. confermare la diagnosi oncologica di altri laboratori collaboranti col Centro;
2. attuare la standardizzazione di metodiche;
3. utilizzare e diffondere i metodi ufficiali di analisi redatti secondo le norme EN 17025;
4. organizzare corsi di formazione, aggiornamento e perfezionamento destinati al personale di altri IIZZSS ed Enti di ricerca nel campo dell'oncologia veterinaria;
5. analizzare i dati epidemiologici di animali residenti in diversi territori, compararli tra loro e con quelli umani, predisponendo eventuali piani di intervento (animali sentinella);



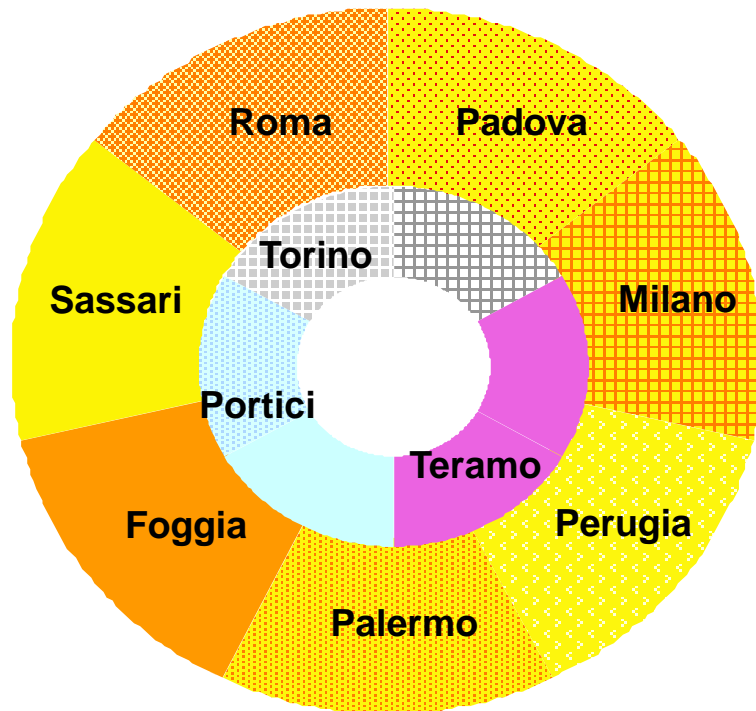
## CEROVEC NEL 2019

1. 2019 profondo riassetto organizzativo
2. ridistribuzione delle attività
3. coinvolgimento di numerose strutture dell'IZS PLV

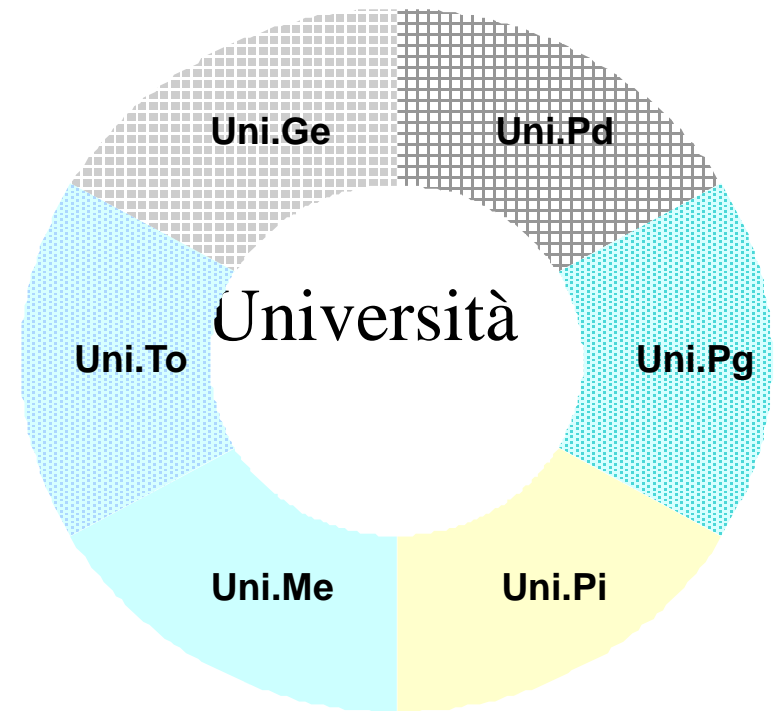




## Collaborano col CEROVEC.....



**II.ZZ.SS**



**.....raccolta dati tumori, ring test diagnostici, progetti di ricerca...**



S.S. biostatistica, epidemiologia  
e analisi del rischio

**EPIDEMIOLOGIA E SORVEGLIANZA CLINICA**

S.S. Istopatologia

**ATTIVITA' DIAGNOSTICA**

S.S. Diagnostica Oncologica  
S.S. Genova

**RICERCA E SPERIMENTAZIONE**



## S.S. biostatistica, epidemiologia e analisi del rischio

## EPIDEMIOLOGIA E SORVEGLIANZA CLINICA

- Creazione banca dati
- Sviluppo e gestione di sistemi informativi
- Studio, sviluppo e gestione di sistemi di sorveglianza, verifica e controllo
- Aggiornamenti epidemiologici sulle materie di competenza



## S.S. Istopatologia

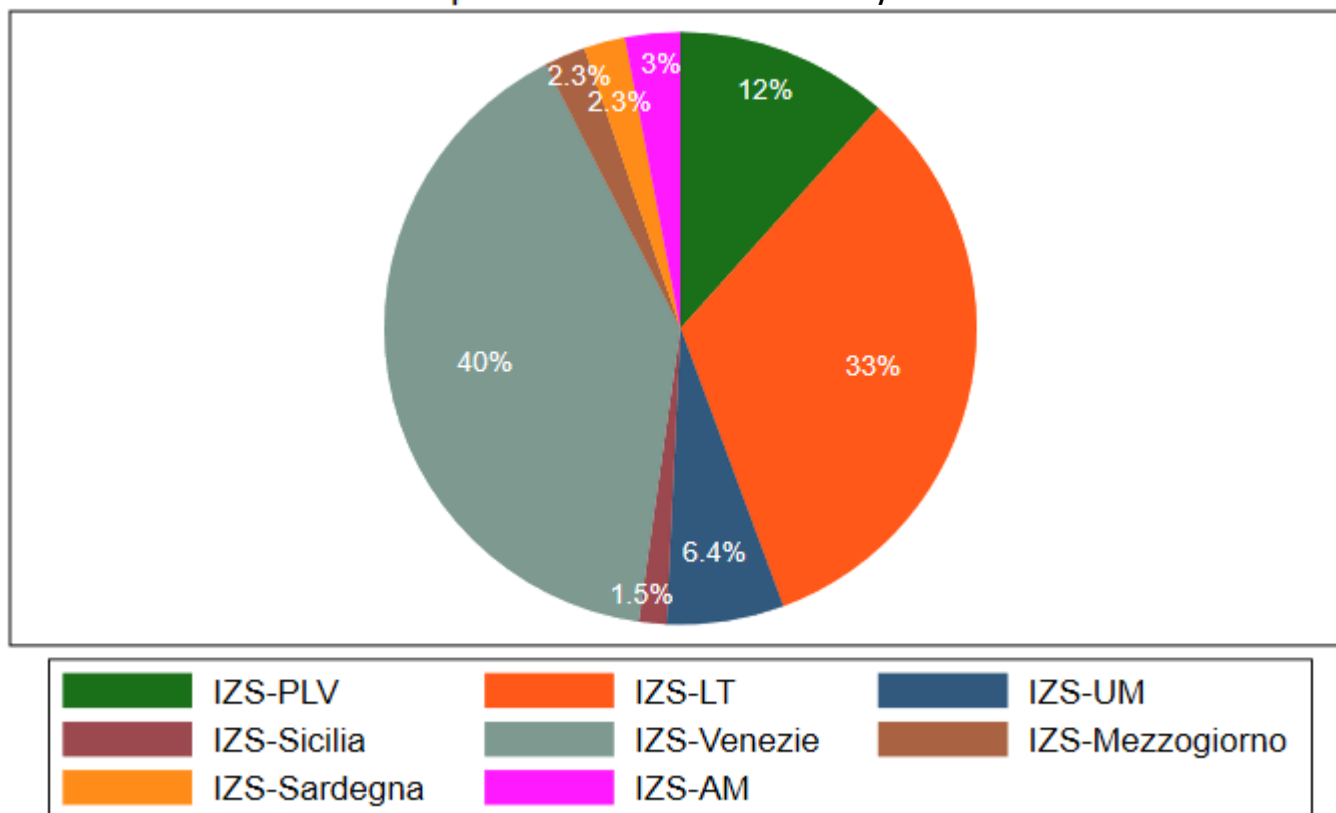
## ATTIVITA' DIAGNOSTICA

- Standardizzazione e validazione di metodiche analitiche
- Produzione e distribuzione di reagenti
- Attività analitica di routine
- Circuiti inter-laboratorio organizzati dal CEROVEC



## CCS felino in Italia: i Dati Nilov

Percentuale di casi di CCS per IZS  
nel periodo 01/01/2013-30/09/2019

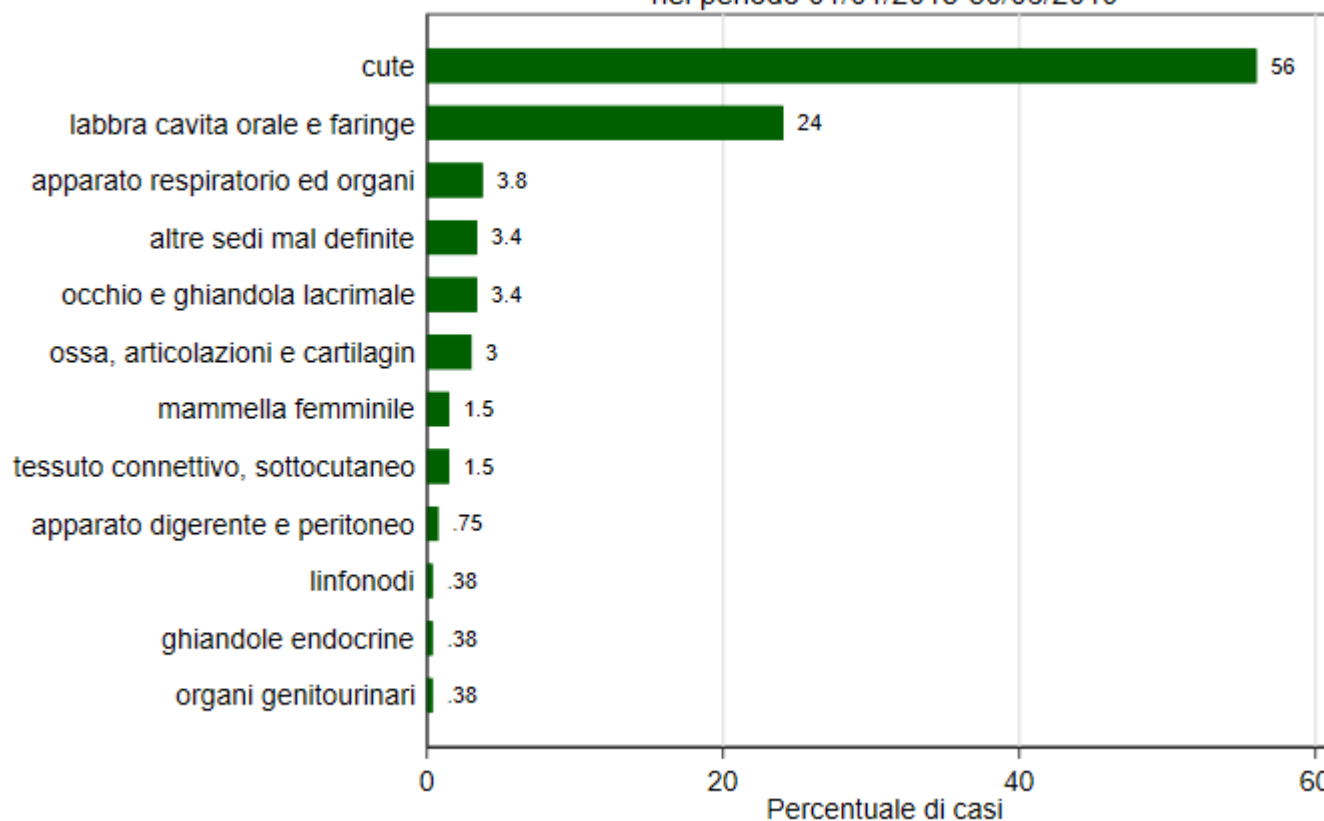


Fonte dei dati: NILOV



## CCS felino

Sede di localizzazione dei casi di CCS nel gatto (n=266)  
nel periodo 01/01/2013-30/06/2019



Fonte dei dati: NILOV



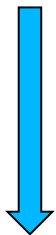
## Casistica Fornita come UO del progetto

	RAZZA	ETA'	SEDE	DIAGNOSI	PRELIEVO	SESSO
1	EUROPEO	13,5	NARICE sinistra	CS primario	<b>Autoptico</b>	M
2	PERSIANO	11	CUTE inguinale sinistra, zona mammaria	CS (primario)	<b>Chirurgico</b>	F
3	EUROPEO	10	CUTE zona OCCIPITALE	CS (primario con linfangiosi npl.)	<b>Chirurgico</b>	F
4	EUROPEO	13	CUTE toracica, zona mammaria	CS (primario)	<b>Chirurgico</b>	MC
5	EUROPEO	14	CUTE periorbitale e palpebra	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	FS
6	EUROPEO	-	MUCOSA PALATO DURO e GENGIVA	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	F
7	PERSIANO	5,5	DITO MANO SINISTRA	CS	<b>Autoptico</b>	FS
8	-	-	DITO PIEDE SINISTRO	CS	<b>Autoptico</b>	-
9	PERSIANO	-	POLMONE	CS (primario)	<b>Autoptico</b>	FS
10	EUROPEO	5	CUTE sopraorbitale destra	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	M
11	EUROPEO	15	MUCOSA gengivale e palatina	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	MC
12	EUROPEO	11	CUTE costato (a cm.1,5 l'uno dall'altro)	Carcinoma basosquamoso	<b>Chirurgico</b>	M
13	EUROPEO	8	TESSUTI MOLLI parete addominale	CS metastatico (origine ignota)	<b>Chirurgico</b>	MC
14	EUROPEO	14	PADIGLIONE AURICOLARE Destro	Cheratosi Actinica	<b>Chirurgico</b>	FS
15	PERSIANO	8,5	LINGUA	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	FS
16	EUROPEO	17,5	LINGUA (base e frenulo)	CS (primario)	<b>Autoptico</b>	FS
17	EUROPEO	12	CAVITA' ORALE (sottolinguale)	CS (primario)	<b>Autoptico</b>	FS
18	EUROPEO	12	PUNTA del NASO	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	FS
19	EUROPEO	12	LINGUA (base)	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	MC
20	EUROPEO	8	GENGIVA mascellare (arcata zigomatica)	CS (primario)	<b>Bioptico</b>	MC
21	EUROPEO	5,5	PINNA AURICOLARE	CS (primario)	<b>Chirurgico</b>	F
22	EUROPEO	6,5	CUTE dorso del COLLO	CS (primario con linfangiosi npl.)	<b>Chirurgico</b>	FS
23	EUROPEO	6,5	PINNA AURICOLARE	CS (primario con linfangiosi npl.)	<b>Chirurgico</b>	F
24	EUROPEO	7	NASO	CS	<b>Bioptico</b>	F
25	EUROPEO	8	CONDOTTO AURICOLARE Sinistro	CS ed emangiosarcoma	<b>Chirurgico</b>	F
26	EUROPEO	14	PADIGLIONE AURICOLARE Destro	CS	<b>Chirurgico</b>	M
27	EUROPEO	10	LABBRO SUPERIORE E TARTUFO	CS	<b>Bioptico</b>	M
28	EUROPEO	13	NASO	CS	<b>Bioptico</b>	MC
					<b>Bioptico</b>	FS



## Casistica Fornita come UO del progetto

**28 GATTI ADULTI**

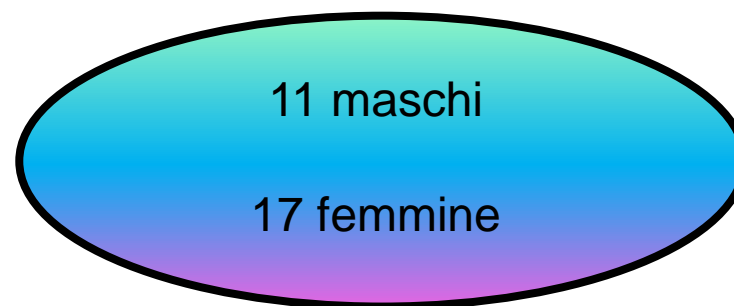


Eta' media  
 **$10,4 \pm 3,4$**

**Range 6-18 anni**



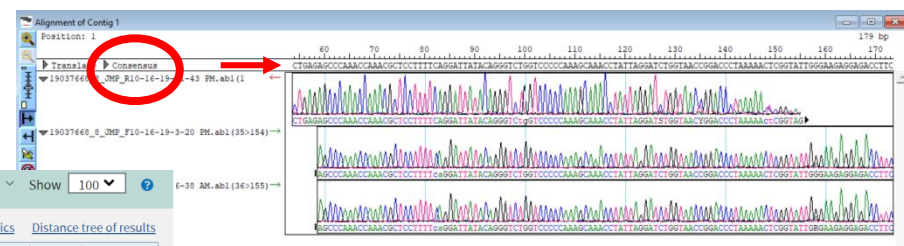
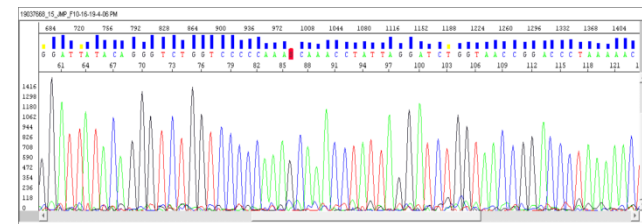
**23 EUROPEO**  
**1 NC**  
**4 PERSIANO**



## Analisi eseguite come UO del progetto

### Sequenziamento diretto con metodo Sanger:

- Frammento di 177 bp del gene L1 di FePV (Munday et al., 2008)
- Frammento di 126 bp del gene E2 di FePV (Altamura et al., 2016)



Sequences producing significant alignments

select all 100 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Accession
Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007, complete genome	320	320	98%	1e-83	100.00%	NC_038520.1
Feline nasopharyngeal carcinoma papillomavirus major capsid protein gene, partial cds	320	320	98%	1e-83	100.00%	EF447284.1
Human papillomavirus isolate FA162 major capsid protein L1 (L1) gene, partial cds	113	113	86%	3e-21	76.13%	DQ418477.1
Human papillomavirus isolate FA47 major capsid protein L1 gene, partial cds	105	105	79%	5e-19	76.22%	AY008881.1

Gene L1

Sequences producing significant alignments

select all 41 sequences selected

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident.	Accession
Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007, complete genome	225	225	98%	5e-55	99.21%	NC_038520.1
Streptomyces sp. ADI95-16 plasmid pADI95-16a, complete sequence	53.6	53.6	40%	0.002	84.62%	CP033582.1
Streptomyces sp. ADI95-16 plasmid pADI95-16a, complete sequence	51.8	51.8	39%	0.006	84.62%	CP033582.1
Streptomyces hygroscopicus subsp. limoneus strain KCTC 1717 chromosome I, complete sequence	48.2	48.2	39%	0.073	80.39%	CP013219.1
Streptomyces hygroscopicus subsp. jinggangensis TL01, complete genome	48.2	48.2	39%	0.073	80.39%	CP003720.1

Gene E2



U.S. National Library of Medicine | NCBI | National Center for Biotechnology Information

BLAST®

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance.

End of updates for BLAST+ version 4 databases (BIV4)  
Start moving to the new version 5 databases!  
Fri, 27 Sep 2019 16:00:00 EST

Web BLAST

Nucleotide BLAST  
nucleotide vs. nucleotide

blastx  
translated nucleotide vs. protein

tblastn  
protein vs. translated nucleotide

Protein BLAST  
protein vs. protein





## CCS felino ed infezione da PVs in Italia

*Journal of Feline Medicine and Surgery* (2019) 21, 409–418

**CLINICAL REVIEW**

### NOVEL VIRUSES Update on the significance of papillomavirus infections in cats

**John S Munday, Claire R Sharp and Julia A Beatty**



- Circa 80% CCS cutanei associati ad infezione da PV
- Necessità di suddividere le patologie cutanee in PVs+ e PVs-



## CCS felino ed infezione da PVs in Italia

Original Article



### **A study of multiple *Felis catus* papillomavirus types (1, 2, 3, 4) in cat skin lesions in Italy by quantitative PCR**

*Journal of Feline Medicine and Surgery*

2018, Vol. 20(8) 772–779

© The Author(s) 2017

Reprints and permissions:

[sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav](http://sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav)

DOI: 10.1177/1098612X17732255

[journals.sagepub.com/home/jfm](http://journals.sagepub.com/home/jfm)

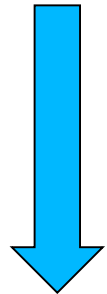
This paper was handled and processed  
by the European Editorial Office (ISFM)  
for publication in *JFMS*



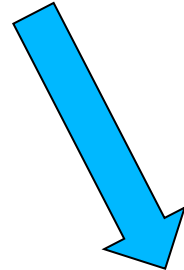
**Maurizio Mazzei<sup>1</sup>, Mario Forzan<sup>1</sup>, Vito Carlucci<sup>1</sup>,  
Antonio G Anfossi<sup>2</sup>, Alberto Alberti<sup>2</sup>, Francesco Albanese<sup>3</sup>,  
Diana Binanti<sup>4</sup>, Francesca Millanta<sup>1</sup>, Lisa Baroncini<sup>1</sup>,  
Andrea Pirone<sup>1</sup> and Francesca Abramo<sup>1</sup>**

S.S. Sezione di Genova  
S.S. Diagnostica  
Oncologica

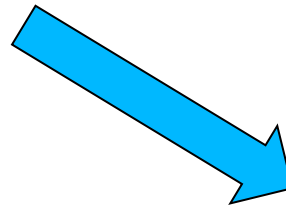
**RICERCA E SPERIMENTAZIONE**



Cavallo



Cane



Gatto



- Patogenesi
- Risposta immunitaria
- Terapie innovative
- Modelli in vitro





## Ultime attività di ricerca 2015-2018

### *Progetti in cui CEROVEC è capofila*

- 2015** Valutazione in vitro del potenziale anti-tumorigeno di un ceppo attenuato di *Salmonella Typhimurium* (STM $\Delta$ znuABC)
- 2016** Colture ex vivo di mastocitoma cutaneo canino per lo studio della biologia dei mastociti neoplastici: sviluppo di un modello animale in oncologia comparata
- 2017** Geni Driver e MicroRNA nella patogenesi dell'osteosarcoma canino: identificazione di biomarcatori in oncologia comparata e potenziamento delle indagini epidemiologiche nell'ambito della rete NILOV degli IIZZSS
- 2018** Papillomavirus equino: modello di studio in oncologia comparata



## **PROGETTO DI RICERCA CORRENTE 2018**

***Papillomavirus equino: modello di studio in oncologia comparata***

### **OBIETTIVI**

- **Caratterizzazione della risposta immunitaria innata nei SCC**
- **Identificazione dei virus presenti nei SCC**
- **Miglioramento del decorso post-operatorio nei cavalli trattati.**
- **Valutare il cavallo quale modello in oncologia comparata.**



## *Obiettivi e Attività*



### **Messa a punto di metodi biomolecolari per la Ec-PVs**

1. Protocolli per identificazione del genoma di Ec-PVs
2. Protocolli per valutazione dell'espressione genica Ec-PV2
3. Screening soggetti sani
4. Protocolli per valutazione dell'espressione geni immunità



### **Caratterizzazione della risposta immunitaria locale dei tumori**

1. Reperimento di campioni di archivio FFPE dalle varie UUOO
2. Valutazione marker popolazioni cellulari della risposta immunitaria locale dei tumori



## **Sviluppo PCR per EC-PVs e detection**

**Test su :** CCS nuovi e da archivio  
Cytobrush  
Tampone

**PCR L1** (201 pdb)

**PCR E1/E7** (337 pdb)

**GAPDH** (390 pdb) e **B-act** (184 pdb) controlli di amplificazione

**Positivi sequenziamento di L1 in toto mediante metodo Sanger**

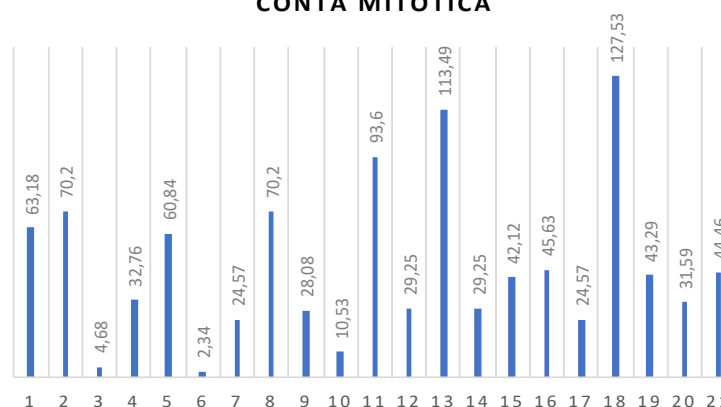
# Valutazione istopatologica 22 casi d'archivio

Diagnosi di carcinoma squamoso in 19 casi e di papilloma squamoso in 2 casi

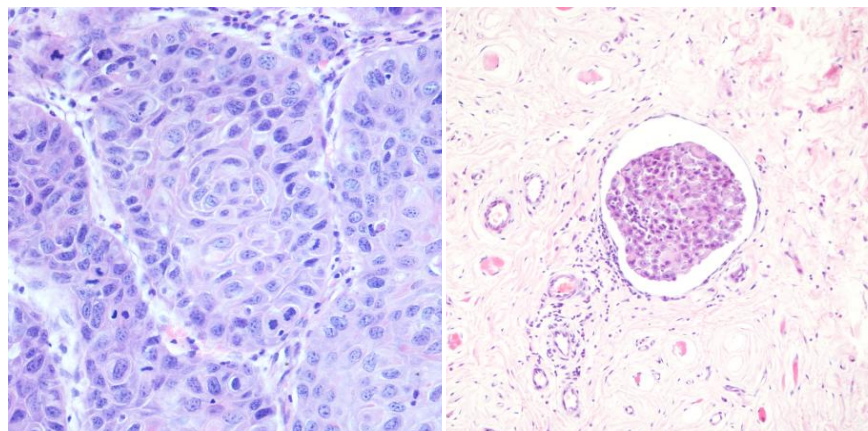
**GRADO DI DIFFERENZIAMENTO (SCC)**

**CONTA MITOTICA**

0 (Anaplastico)                      1 (Scarsamente differenziato)  
2 (Moderatamente differenziato)    3 (Ben differenziato)

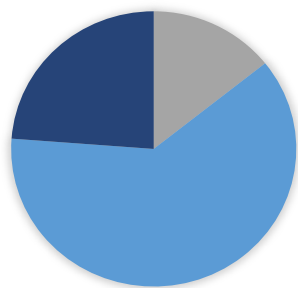


- Evidenza di invasione vascolare: 3/21 casi
- Koilocitosi: 3/21 casi
- Ulcerazione: 16/21 casi



Valutazione istopatologica 22 casi d'archivio

Grado di infiammazione

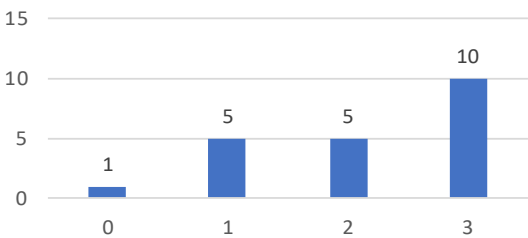


0 (assente) 1 (lieve)  
2 (moderata) 3 (grave)

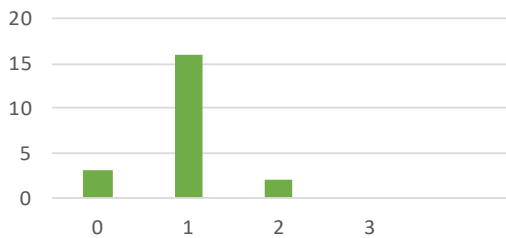
Localizzazione infiltrato infiammatorio

Prevalentemente intratumorale  
Prevalentemente extatumorale  
Entrambe

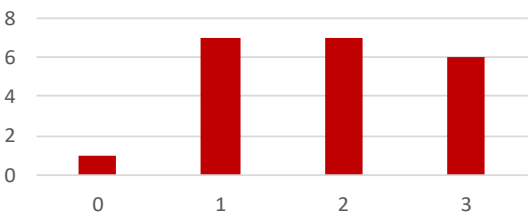
Linfociti



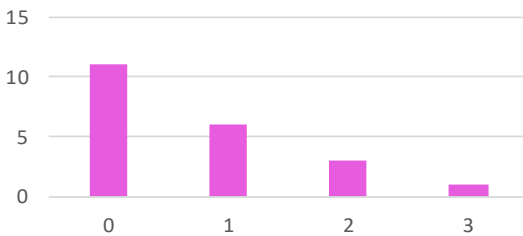
Macrofagi



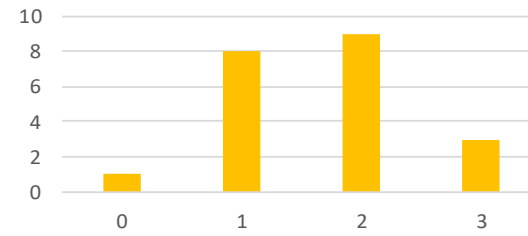
Plasmacellule



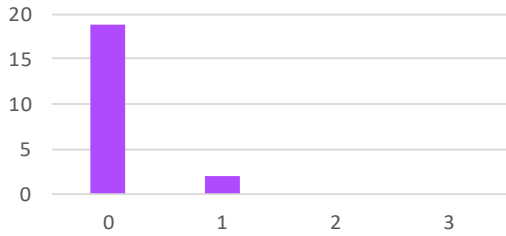
Eosinofili



Neutrofili



Mastociti







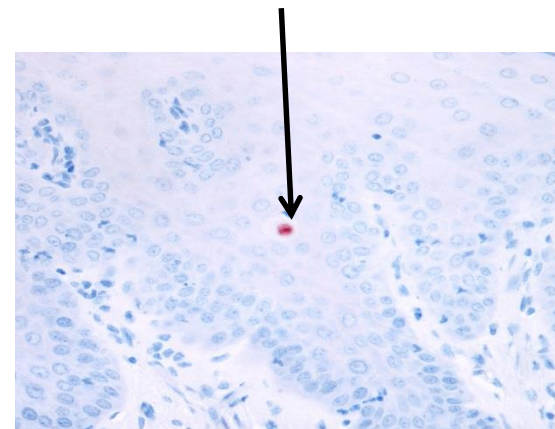
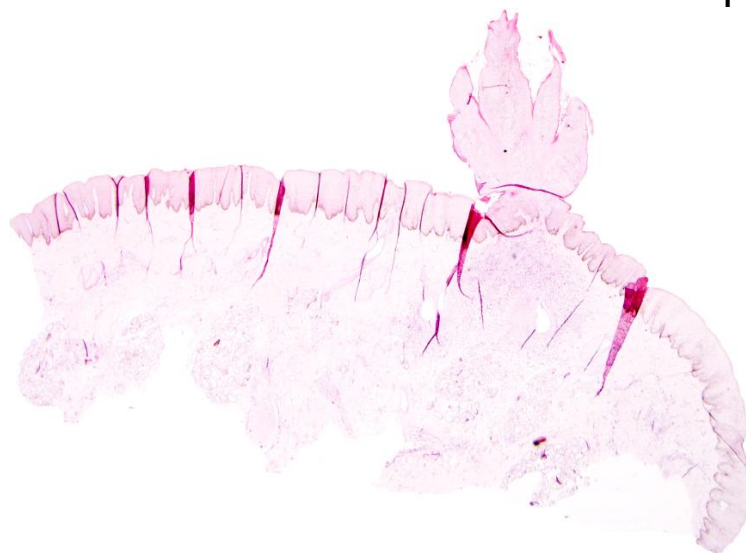
# IMMUNOISTOCHEMICA PER PV (PROTEINA CAPSIDICA L1)

Tutti i casi finora valutati sono risultati negativi, anche i papillomi.

Possibili spiegazioni:

- papillomi esaminati (2) non ad eziologia virale
- scarsa espressione dell'antigene L1
- anticorpo non riconosce L1 ECPV2? → In iperplasia vulva positività presenti

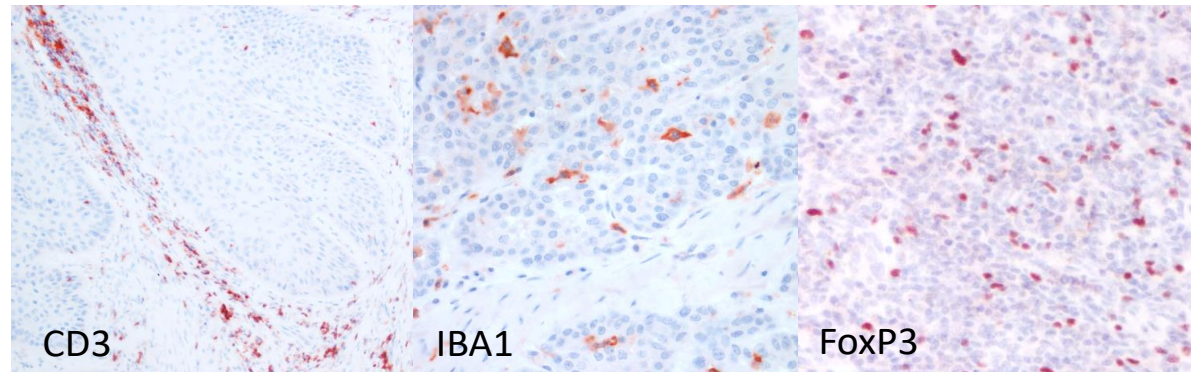
Positività L1 in iperplasia vulvare di cavallo  
positivo per EC-PV2



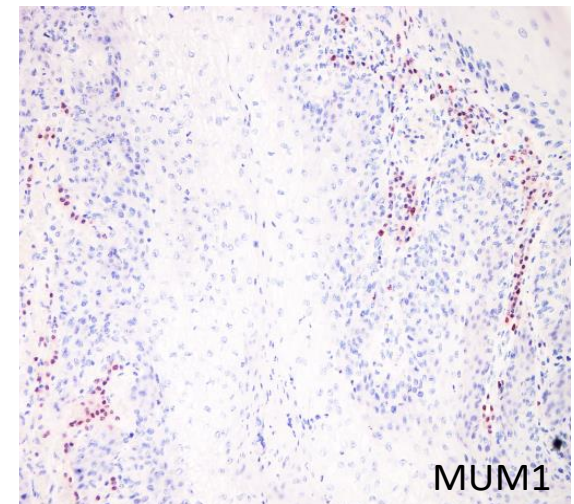
# VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA RISPOSTA IMMUNITARIA

Marker selezionati:

- CD3 → in corso
- CD20
- FoxP3 → in corso
- Mac387
- IBA1 → in corso



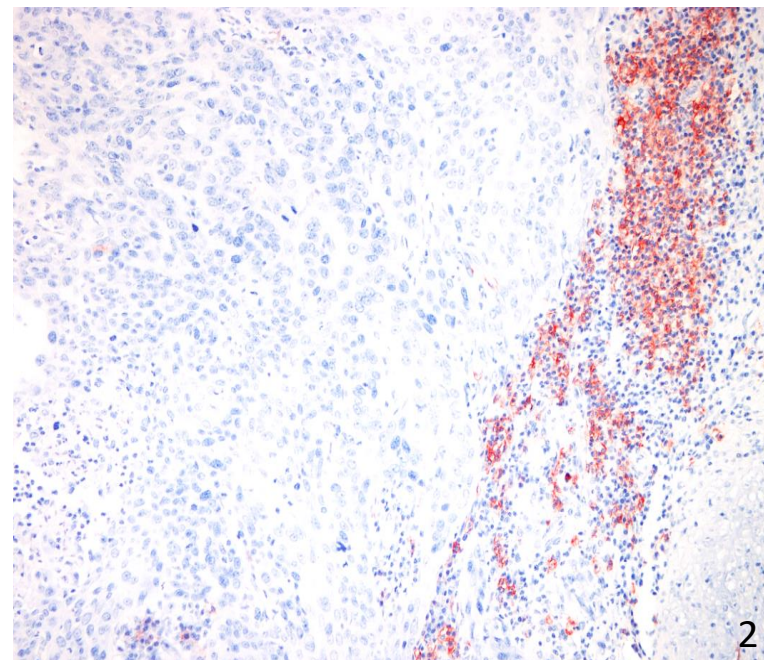
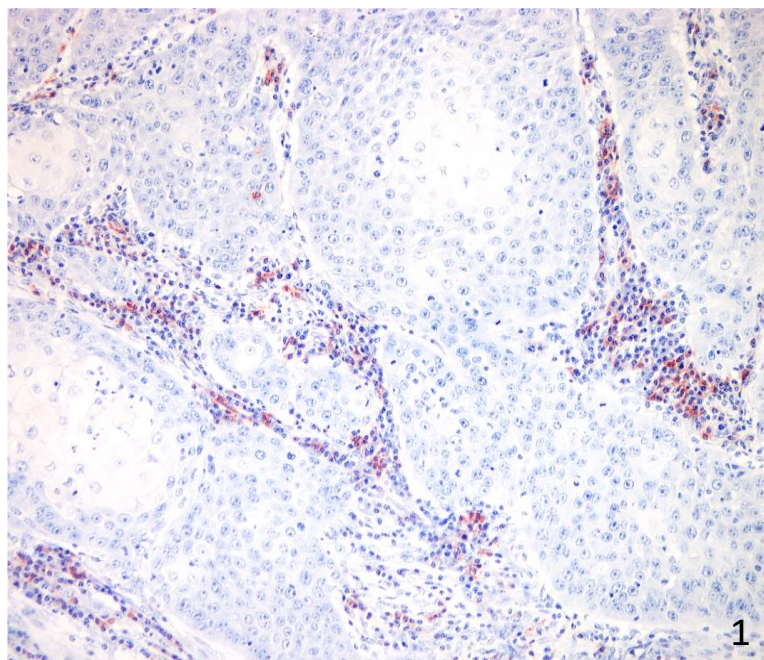
- Alcuni di questi già utilizzati in lavori pubblicati sul cavallo, ma mancanza di una conferma della cross-reattività con gli antigeni equini e validazione (**Western Blot**)
- Vista la grande quantità di plasmacellule evidenziate, potrebbe essere utile inserire nel panel per la valutazione della RI anche **MUM1** (differenziazione plasmacellule)





# VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA RISPOSTA IMMUNITARIA

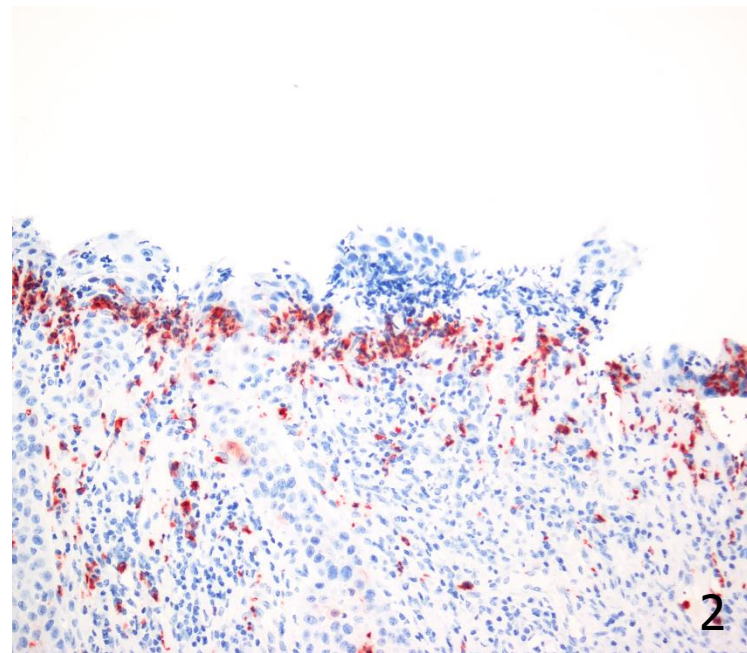
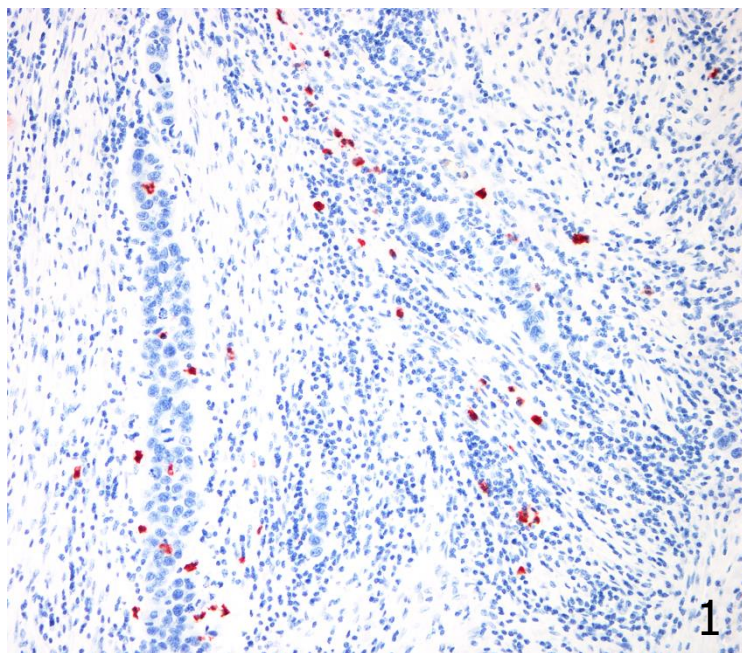
CD20



Sono state evidenziate cellule CD20<sup>+</sup> sia a livello intratumorale (1) che alla periferia della neoplasia (2).

# VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHIMICA RISPOSTA IMMUNITARIA

MAC387



L'espressione della calprotectina (antigene target dell'anticorpo Mac387) è osservata sia nei monociti/macrofagi che infiltrano il tumore (Fig.1) che nei neutrofili presenti in corrispondenza delle aree di ulcerazione superficiale (Fig.2).





## ESPRESSIONE GENICA

- citochine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNFA, IL-18, IL-10 ed IL-12 (p35 e p40))
- fattori di trascrizione (NF-kB1 e p65)
- fattori di crescita cellulare (TGF-b1)
- IFNS (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ )
- TLRs (**TLR4 e TLR9**)
- MCHI e II

## VALUTAZIONE MACROSCOPICA





## Dati

Pony femmina 20 anni  
Papilloma vulvare e CCS gastrico  
Positivi per E1/E7 PCR e sequenziamento

## Sintomi

Letargia, anoressia, perdita di peso.  
Massa genitale a livello vulvare  
presente 7 mesi prima della morte.





## **PROGETTO DI RICERCA CORRENTE 2019**

***Terapia immunologica in oncologia veterinaria: valutazione della risposta immunitaria indotta dall'autovaccino nel trattamento dei sarcoidi equini***





## **Nuove conoscenze/informazioni che il progetto si prefigge di produrre**

Approfondire tre punti essenziali riguardanti le infezioni da BPVs negli equidi



**1) implementare le conoscenze relative alla regolazione e progressione tumorale caratterizzando la risposta immunitaria determinata dall'interazione ospite-patogeno (BPVs);**

*in vivo* utilizzando tumori spontanei

*in vitro* con l'impiego di modelli cellulari

**I dati acquisiti forniranno informazioni sul microambiente immunitario con particolare riferimento all'infiltrato cellulare ed alla modulazione dei TLRs, nonché del sistema IFNs.**

**2) Testare l'efficacia degli autovaccini, normati in Italia dal D.l.vo 287/94, nella terapia dei sarcoidi caratterizzando in vivo sia la risposta immunitaria innata che adattativa (Th1/Th2).**

**3) Sulla base di evidenze scientifiche recentemente pubblicate verranno valutati i miRNA circolanti quali possibili marcatori prognostici.**

# IZSTO

Istituto Zooprofilattico  
Sperimentale del Piemonte,  
Liguria e Valle d'Aosta

CENTRO  
DI RIFERENZA  
NAZIONALE  
PER L'ONCOLOGIA  
VETERINARIA  
E COMPARATA  
Sezione Liguria  
IZS PLV - Genova



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL' EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA  
DAL 1250 CONFERIAMO IL FUTURO



Azienda USL Toscana nord ovest  
Massa Carrara | Lucca | Versilia | Pisa | Livorno



# Grazie per l'attenzione



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI TORINO

Dipartimento di Scienze Veterinarie



UNIVERSITÀ DI PISA



Istituto Superiore di Sanità  
Benvenuti



RIGENERA ACTIVA