

Rapid Point-of-Care testing for feline and canine parvovirus (FPV/CPV) using the portable isothermal loop-mediated nucleic acid amplification PLUSLIFE platform

Laboratorio di Malattie Infettive degli Animali, Dipartimento di Medicina Veterinaria,
Università degli Studi di Teramo

Laboratory Study Report: Valutazione della sensibilità e specificità di un test POC – FPV/CPV basato sull'identificazione degli acidi nucleici

Sistema investigato: Pluslife Mini Dock (Guangzhou Pluslife Biotech, Guangzhou, China)



07 Giugno 2024

INDICE

1.	INTRODUZIONE.....	3
2.	OBIETTIVO DELLO STUDIO	3
3.	MATERIALI E METODI	3
3.1	Campionamento	3
3.2	Screening molecolare mediante PCR qualitativa e real time PCR (qPCR).....	4
3.3	Analisi eseguita mediante impiego del POC “FPV/CPV Nucleic Acid test (PLuslifeFPV/CPV Card)” e device Pluslife Mini Dock	4
3.4	Analisi dei dati.....	4
4	RISULTATI.....	5
5.	DISCUSSIONI	9
6.	BIBLIOGRAFIA	10

1. INTRODUZIONE

La parvovirosi del cane e la panleucopenia felina sono due gravi malattie infettive, altamente contagiose e spesso con esito fatale, sostenute da parvovirus appartenenti alla famiglia *Parvoviridae*, genere *Protoparvovirus*, specie *Protoparvovirus carnivoran*¹. In particolare, la parvovirosi canina o gastroenterite emorragica del cane è sostenuta dalle tre varianti del parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c, mentre la panleucopenia felina è sostenuta nel 90-95% dei casi dal parvovirus felino (FPV, feline parvovirus) e in meno del 10% dalle varianti CPV-2a, CPV-2b e CPV-2c. In entrambe le malattie infettive, l'animale infetto elimina il virus, anche prima della comparsa dei sintomi clinici, attraverso tutti gli escreti e secreti in grande quantità, sebbene l'eliminazione fecale rappresenti la fonte principale di disseminazione del virus nell'ambiente. La trasmissione dell'infezione può avvenire, quindi, sia per via diretta ma considerata la notevole resistenza nell'ambiente di CPV ed FPV, soprattutto per via indiretta.

I casi clinici tipici sono facilmente riconoscibili, ma soggetti asintomatici o con segni atipici possono non essere riconosciuti. Risulta, quindi, necessario ottenere una diagnosi eziologica basata principalmente sull'impiego di test diagnostici diretti cioè finalizzati alla ricerca del patogeno, antigene o genoma virale, per intervenire rapidamente con una corretta profilassi al fine di prevenire la diffusione dell'infezione.

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Nel presente report, si riportano i risultati di uno studio preliminare finalizzato a valutare la sensibilità e la specificità di un test POC – FPV/CPV basato sull'identificazione del DNA di FPV e CPV-2 mediante device Pluslife Mini Dock (Pluslife FPV/CPV Card).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Sono stati sottoposti ad analisi 55 campioni di origine enterica, rappresentati da tamponi rettali, provenienti da 47 gatti e 8 cani, ricoverati presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Teramo nel periodo compreso tra marzo 2023 e marzo 2024. Al momento del prelievo, per ogni animale in esame è stata compilata una scheda di rilevamento anamnestica in cui sono state raccolte informazioni relative alla sintomatologia in atto e ad eventuali trattamenti farmacologici o vaccinali.

3.2 Screening molecolare mediante PCR qualitativa e real time PCR (qPCR)

Un totale di 200 µl di PBS in cui era stato risospeso ciascun tampone è stato sottoposto ad estrazione degli acidi nucleici mediante kit del commercio ZymoBIOMICS MagBead DNA/RNA (Zymo Research, USA). Ciascun estratto di DNA (1 µl) è stato testato utilizzando una procedura precedentemente validata di PCR qualitativa specifica per i membri della specie *Protoparvovirus carnivoran1* (Buonavoglia et al., 2001). Le reazioni di PCR, allestite utilizzando la GoTaq® Green Master Mix (Promega Italia S.r.l, Milan, Italy), sono state effettuate nel termociclatore “SimpliAmp” (Applied Biosystem, Foster, CA, USA). Inoltre, tutti gli estratti di DNA (2,5 µl) sono stati testati utilizzando una procedura specifica di qPCR per il parvovirus felino e canino (Streck e coll., 2013). È stata generata una curva standard utilizzando diluizioni logaritmiche da 10^{10} a 10^0 copie per reazione, clonando il frammento ottenuto in PCR qualitativa, all’interno del vettore pCR 2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen, Ltd, Milan, Italy). Le reazioni di qPCR, allestite utilizzando la TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystem, Foster, CA, USA), sono state effettuate nel termociclatore “StepOne” (Applied Biosystem, Foster, CA, USA). Entrambe le strategie sono state eseguite alle condizioni termiche indicate nella bibliografia di riferimento.

3.3 Analisi eseguita mediante impiego del POC “FPV/CPV Nucleic Acid test (PLuslife FPV/CPV Card)” e device Pluslife Mini Dock

Per l’analisi mediante il device Pluslife Mini Dock ciascun tampone è stato risospeso nel lysis buffer fornito dal kit FPV/CPV Nucleic Acid Test Card (Pluslife FPV/CPV Card) e sono state eseguite le procedure indicate dalla ditta produttrice. I campioni risultati invalidi o per i quali è stato necessario approfondire le analisi, sono stati sottoposti a diluizione. In particolare, 100 µl di PBS in cui era stato risospeso ciascun tampone fecale sono stati sottoposti a diluizione 1:10 in 900 µl di PBS e, quando necessario, ulteriormente diluiti 1:100. Per l’esecuzione delle analisi sono stati impiegati i seguenti device Pluslife Mini Dock:

- Device 1 Serial No.: 2247040335;
- Device 2 Serial No.: 2247040336.

3.4 Analisi dei dati

Per valutare la concordanza tra i risultati di PCR, qPCR e i risultati ottenuti al test POC Pluslife sono stati calcolati i seguenti parametri:

- Concordanza Percentuale Positiva (*Positive Percent Agreement*-PPA, sensibilità), calcolata mediante valutazione del numero di campioni positivi in PCR e qPCR, che vengono rilevati correttamente come “positivi” anche dal test POC;
- Concordanza Percentuale Negativa (*Negative Percent Agreement*-NPA, specificità), calcolata mediante valutazione del numero di campioni negativi in PCR e qPCR, che vengono rilevati correttamente come “negativi” anche dal test POC;
- L'accuratezza diagnostica complessiva è stata calcolata determinando il numero di campioni in cui entrambe le analisi sono risultate in accordo.

4 RISULTATI

Le prove di PCR qualitativa specifica per i membri della specie *Protoparvovirus carnivoran1*, eseguite sui 55 tamponi rettali, hanno permesso di identificare la banda del peso molecolare atteso in 26 campioni (47,3%, 26/55), mentre 29 campioni sono risultati negativi (52,7%, 29/55). In particolare, dei 47 campioni di origine felina, 21 campioni (44,6%, 21/47) sono risultati positivi e 26 negativi (55,3%, 26/47), mentre degli 8 campioni di origine canina 5 (62,5%, 5/8) sono risultati positivi e 3 (37,5%, 3/8) negativi.

L'impiego della strategia di qPCR ha permesso di evidenziare 41 campioni (74,5%, 41/55) come positivi per FPV/CPV, 35 di origine felina (74,5%, 35/47) e 6 di origine canina (75,0%, 6/8), e 14 campioni come negativi (25,4%, 14/55), 12 (25,5%, 12/47) collezionati da gatti e 2 (25,0%, 2/8) da cani. In particolare, i campioni positivi per FPV/CPV mostravano valori di *threshold cycle* (Ct) che variavano da 11,70 a 38,34 (media Ct: 29,18), con cariche virali comprese tra $1,11 \times 10^1$ e $1,08 \times 10^9$ copie di DNA/2,5 µl di estratto (media $3,45 \times 10^7$ copie di DNA/2,5 µl di estratto).

L'analisi dei 55 campioni eseguita con il test POC “FPV/CPV Nucleic Acid” Pluslife ha identificato 34 campioni positivi (61,8%, 34/55), 28 (59,6%, 28/47) di origine felina e 6 (75,0%, 6/8) di origine canina, 16 (29,1%, 16/55) negativi di cui 14 (29,8%, 14/47) collezionati da gatti e 2 (25,0%, 2/8) da cani, mentre 5 test (9,1%, 5/55), tutti eseguiti su campioni felini, sono risultati invalidi anche testati alle diluizioni di 1:10 e 1:100.

I risultati così ottenuti dall'analisi con il test POC “FPV/CPV Nucleic Acid” Pluslife sono stati comparati con i risultati ottenuti, rispettivamente, negli screening eseguiti con le procedure di PCR qualitativa e qPCR.

Nel dettaglio, è emerso che dei 26 campioni positivi alla PCR, il test POC Pluslife ha rilevato 23 campioni positivi (18 di origine felina e 5 canina), mentre 3 test sono risultati invalidi. La PPA calcolata

è risultata quindi del 88,5% (23/26). Dei 29 campioni negativi in PCR, 16 sono risultati negativi anche al test POC Pluslife (14 collezionati da gatti e 2 da cani), per cui la NPA calcolata, risulterebbe del 55,2% (16/29).

I risultati delle prove eseguite mediante PCR qualitativa e test POC “FPV/CPV Nucleic acid” Pluslife sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1

ID GATTO	PCR QUALITATIVA (Buonavoglia et al., 2001)	DEVICE PLUSLIFE
1	NEG	NEG
2	NEG	NEG
3	NEG	NEG
4	NEG	NEG
5	NEG	NEG
6	NEG	NEG
7	NEG	NEG
8	NEG	NEG
9	NEG	NEG
10	NEG	NEG
11	NEG	NEG
12	NEG	NEG
13	NEG	NEG
14	NEG	NEG
15	NEG	POS
16	NEG	POS
17	NEG	POS
18	NEG	POS
19	NEG	POS
20	NEG	POS
21	NEG	POS
22	NEG	POS
23	NEG	POS
24	NEG	POS
25	POS	POS
26	POS	POS
27	POS	POS
28	POS	POS
29	POS	POS
30	POS	POS
31	POS	POS
32	POS	POS

33	POS	POS
34	POS	POS
35	POS	POS
36	POS	POS
37	POS	POS
38	POS	POS
39	POS	POS
40	POS	POS
41	POS	POS
42	NEG T.Q., POS 1:10	POS
43	POS	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100
44	POS	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100
45	POS	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100
46	NEG	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100
47	NEG	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100
ID CANE	PCR QUALITATIVA (Buonavoglia et al., 2001)	DEVICE PLUSLIFE
1	NEG	NEG
2	NEG	NEG
3	NEG	POS
4	POS	POS
5	POS	POS
6	POS	POS
7	POS	POS
8	POS	POS

Dei 41 campioni risultati positivi alla strategia di qPCR per FPV/CPV-2, 32 (26 di origine felina e 6 canina) sono risultati positivi anche al test POC Pluslife, con valori di Ct che variavano da 11,70 a 35,68 (media Ct: 27,8) e con cariche virali comprese tra $7,02 \times 10^1$ e $1,08 \times 10^9$ copie di DNA/2,5 µl di estratto (media $4,42 \times 10^7$ copie di DNA/2,5 µl di estratto), per cui la PPA calcolata è risultata dell'78,0% (32/41).

Dei 14 campioni negativi in qPCR, 10 sono risultati negativi anche al test POC Pluslife. In particolare, 2 campioni risultati negativi sia in PCR che in qPCR, sono risultati positivi solo al test POC e altri 2 campioni negativi sono risultati invalidi, per cui la specificità calcolata come NPA è risultata quindi del 71,4% (10/14).

Considerando gli ulteriori 6 campioni negativi al test POC, erano risultati positivi solo in qPCR ma con valori di Ct compresi tra 35,3 e 38,34 e cariche virali comprese tra $1,11 \times 10^1$ e $9,14 \times 10^1$ copie di DNA/2,5 µl di estratto (media $3,96 \times 10^1$ copie di DNA/2,5 µl di estratto).

Infine, considerando i 5 campioni invalidi al test POC, 3 risultavano positivi sia in PCR che in qPCR con valori di Ct che variavano da 24,46 a 32,59 (media Ct: 28,08) e con cariche virali comprese tra $6,00 \times 10^2$ e $1,70 \times 10^5$ copie di DNA/2,5 µl di estratto (media $6,56 \times 10^4$ copie di DNA/2,5 µl di estratto), mentre 2 risultavano negativi ad entrambe le procedure.

I risultati delle prove eseguite mediante qPCR e test POC “FPV/CPV Nucleic acid” Pluslife sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2

ID GATTO	DEVICE PLUSLIFE	qPCR	
		Ct	Quantity
1	NEG	NEG	NEG
2	NEG	37.89	1,51E+01
3	NEG	36.05	5,43E+01
4	NEG	NEG	NEG
5	NEG	NEG	NEG
6	NEG	NEG	NEG
7	NEG	37.1	2,62E+01
8	NEG	36.5	3,97E+01
9	NEG	35.3	9,14E+01
10	NEG	NEG	NEG
11	NEG	NEG	NEG
12	NEG	NEG	NEG
13	NEG	NEG	NEG
14	NEG	38.34	1,11E+01
15	POS	34.08	2,13E+02
16	POS	NEG	NEG
17	POS	34.5	1,59E+02
18	POS	31.8	1,04E+03
19	POS	NEG	NEG
20	POS	34.48	1,62E+02
21	POS	34.4	1,71E+02
22	POS	34.5	1,59E+02
23	POS	33.93	2,37E+02
24	POS	34.0	2,25E+02
25	POS	25.96	6,01E+04
26	POS	11.7	1,08E+09
27	POS	32.2	7,87E+02
28	POS	33.4	3,42E+02
29	POS	28.9	7,80E+03
30	POS	30.58	2,43E+03
31	POS	15.8	7,00E+07
32	POS	26.73	3,52E+04
33	POS	30.9	1,94E+03
34	POS	32.64	5,80E+02

35	POS	30.6	2,39E+03
36	POS	28.06	1,40E+04
37	POS	19.7	4,66E+06
38	POS	15.4	9,24E+07
39	POS	29.5	5,14E+03
40	POS	23.8	2,70E+05
41	POS	22.97	4,80E+05
42	NEG T.Q., POS 1:10	28.35	1,14E+04
43	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100	24.46	1,70E+05
44	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100	32.59	6,00E+02
45	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100	27.19	2,56E+04
46	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100	NEG	NEG
47	INVALID T.Q., 1:10 E 1:100	NEG	NEG
ID CANE	DEVICE PLUSLIFE	qPCR FPV/CPV-2 (Streck et al., 2013)	
		Ct	Quantity
1	NEG	NEG	NEG
2	NEG	NEG	NEG
3	POS	35.68	7,02E+01
4	POS	25.5	8,28E+04
5	POS	14.6	1,61E+08
6	POS	31.84	1,01E+03
7	POS	21.68	1,18E+06
8	POS	22.8	5,40E+05

L'accuratezza diagnostica complessiva, calcolata sulla base del numero di campioni in cui entrambe le analisi sono in accordo, è risultata rispettivamente del 70,9% (39/55) per la PCR qualitativa e del 76,4% (42/55) per la qPCR.

In aggiunta ai risultati ottenuti, tuttavia, è da notare come un campione (n. 42) positivo sia in PCR qualitativa che in qPCR, è risultato negativo con il test POC Pluslife quando testato tal quale (T.Q.). Lo stesso campione è successivamente risultato positivo anche al POC test Pluslife quando ritestato dopo diluizione 1:10.

5. DISCUSSIONI

In questo studio è stata valutata la sensibilità e la specificità di un test POC – FPV/CPV basato sull'identificazione del DNA di FPV e CPV mediante device Pluslife Mini Dock. A tal fine, sono stati comparati i risultati ottenuti dall'analisi di 55 campioni enterici, collezionati da 47 gatti e 8 cani, eseguita mediante procedure specifiche di PCR qualitativa e qPCR, e i risultati ottenuti dall'analisi

degli stessi mediante device Pluslife Mini Dock e test POC “FPV/CPV Nucleic Acid” (Pluslife FPV/CPV Card).

In totale; dei 55 campioni testati, il test POC Pluslife ha permesso di identificare 34 campioni (28 di origine felina e 6 di origine canina) come positivi. Di questi, 23 erano risultati positivi sia in PCR qualitativa che in qPCR mentre 9 (8 di origine felina ed uno di origine canina) erano stati identificati come negativi in PCR ma positivi in qPCR, rispettivamente con valori di Ct compresi tra 31,8 e 35,68 e cariche virali comprese tra $1,03 \times 10^3$ e $7,02 \times 10^1$ copie di DNA/2,5 µl di estratto. Gli ulteriori due campioni risultati positivi al test POC erano in realtà negativi ad entrambe le procedure di PCR qualitativa e quantitativa.

Considerando il totale dei campioni positivi rilevati in qPCR, la sensibilità del test POC (78,0%, 32/41) potrebbe essere considerata maggiore rispetto alla procedura di PCR qualitativa (63,4%, 26/41) che è stata, infatti, in grado di identificare solo i campioni che in qPCR risultavano positivi fino al Ct di 33,4 (carica virale: $3,4 \times 10^2$ copie di DNA/2,5 µl di estratto).

Relativamente ai negativi, 14 erano i campioni risultati negativi ad entrambe le procedure molecolari. Il test POC Pluslife ha identificato 16 campioni come negativi ma di questi 10 erano i negativi ad entrambe le procedure di PCR e qPCR e 6 negativi solo in PCR qualitativa. Per cui degli ulteriori 4 campioni negativi, 2 sono stati identificati dal test POC come falsi positivi (n. 16 e 19) e 2 sono risultati invalidi. Quindi escludendo i due test invalidi, dei 12 campioni negativi il test POC ne ha rilevati 10 come negativi per cui la NPA risulterebbe dell'83.3% (10/12).

Inoltre, riconsiderando la NPA rispetto alla PCR, escludendo i 9 campioni risultati positivi al test POC e in qPCR e i 2 test invalidi, risulterebbe dell'88,8% (16/18).

Infine, per i 5 campioni risultati costantemente invalidi non è stato possibile comparare i risultati di PCR e qPCR con il test POC Pluslife.

6. BIBLIOGRAFIA

Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J Gen Virol. 2001 Dec;82(Pt 12):3021-3025. doi: 10.1099/0022-1317-82-12-3021.

Streck AF, Rüster D, Truyen U, Homeier T. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. J Virol Methods. 2013 Oct;193(1):6-8. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.04.025.