

Rapid Point-of-Care testing for three feline Upper Respiratory Infection (URI) pathogens 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 – Feline URI basato sull'identificazione degli acidi nucleici

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

Pluslife Mini Dock



*Dispositivo portatile di tipo POCT
per la diagnosi molecolare rapida
con tecnologia RHAM in microfluidica*



9 Novembre 2023

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	3
3. MATERIALI E METODI	4
3.1 Campionamento	4
3.2 Screening molecolare mediante PCR qualitativa	4
3.3 Analisi eseguita mediante impiego del test POC “FHV-1/C. felis/M. felis Nucleic Acid (PLuslife FCM Card)” e device Pluslife Mini Dock	4
3.4 Analisi dei dati	5
4. RISULTATI	5
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	8
6. BIBLIOGRAFIA	9

1. INTRODUZIONE

Le infezioni delle vie respiratorie superiori (URI) del gatto sono causate da un complesso di agenti patogeni virali e batterici altamente contagiosi. Gli agenti patogeni respiratori del gatto includono:

- Herpesvirus felino 1 (FHV-1)
- Calicivirus felino (FCV)
- *Chlamydia felis* (*C. felis*)
- *Mycoplasma felis* (*M. felis*)
- *Bordetella bronchiseptica*
- *Streptococcus zooepidemicus*

Sebbene uno qualsiasi di questi agenti patogeni possa causare un'infezione primaria, la maggior parte dei gatti con sintomatologia respiratoria mostra un'infezione mista. Inoltre, la diagnosi di URI non può essere emessa soltanto sulla base dei segni clinici, in quanto spesso risultano tra loro sovrapponibili. Pertanto, è necessario ricorrere a test di laboratorio specifici finalizzati all'identificazione dell'agente patogeno. L'approccio ad oggi più utilizzato è quello basato sulle metodiche di PCR o RT-PCR, che vengono comunemente impiegate per identificare sequenze bersaglio, rispettivamente, di DNA o RNA a partire da campioni oro-faringei, nasali e congiuntivali.

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

La diagnostica di laboratorio rapida è un approccio moderno della medicina di laboratorio che si è rivelato di estrema importanza per fronteggiare situazioni di emergenza. Esempio emblematico in tal senso è rappresentato dalla pandemia sostenuta da SARS CoV-2.

Più recentemente, sono stati sviluppati nuovi test Point-of-Care (POC), che si differenziano dai ben noti test antigenici poiché impiegando metodi di amplificazione degli acidi nucleici, si sono dimostrati in termini di sensibilità e specificità comparabili alle tradizionali procedure molecolari, ma con il vantaggio di essere di facile esecuzione e di fornire informazioni immediate.

Nel presente report, si riportano i risultati di uno studio preliminare finalizzato a valutare la sensibilità e la specificità di un test POC – Feline URI basato sull'identificazione degli acidi nucleici di FHV-1, *C. felis* e *M. felis* mediante device Pluslife Mini Dock (Pluslife FCM Card).

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento

Sono stati sottoposti ad analisi 43 campioni di origine respiratoria, rappresentati da tamponi oro-faringei o congiuntivali, provenienti da gatti con sintomatologia riferibile a URI. Ciascun tampone è stato risospeso in 1,5 ml di PBS (*Phosphate Buffered Saline*), congelato a -20° C e adeguatamente scongelato a temperatura ambiente prima di ciascuna analisi. I campioni sono stati raccolti presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Teramo nel periodo compreso tra ottobre 2022 e ottobre 2023. Al momento del prelievo, per ogni gatto 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

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 procedure precedentemente validate di PCR qualitativa per FHV-1 e *C. felis* (Di Martino e coll., 2007) e per *M. felis* (Chalker e coll., 2004). 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) alle condizioni termiche indicate nella bibliografia di riferimento.

3.3 Analisi eseguita mediante impiego del POC "FHV-1/C. felis/M. felis Nucleic Acid test (Pluslife FCM 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 FHV-1/C. *felis*/M. *felis* Nucleic Acid Test Card (Pluslife FCM Card) e sono state eseguite le procedure indicate dalla ditta produttrice.

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 ciascuna PCR specifica con 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 per ciascun agente patogeno indagato, 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 per ciascun agente patogeno indagato, 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, specifiche per FHV-1, *C. felis* e *M. felis*, eseguite sui 43 campioni hanno permesso di ottenere i seguenti risultati:

- n.11 campioni positivi solo a FHV-1;
- n.1 campione positivo a *C. felis*;
- n. 10 campioni positivi solo a *M.felis*;
- n. 13 campioni positivi a FHV-1 e *M.felis*;
- n. 8 campioni negativi.

Considerando le positività e negatività relative a ciascun patogeno indagato sono stati identificati:

- n. 24 positivi e n. 19 negativi per FHV-1;
- n. 1 positivo e n. 42 negativi per *C.felis*;
- n. 23 positivi e n. 20 negativi per *M. felis*;
- n. 8 negativi a ciascun patogeno.

I risultati ottenuti nelle analisi di ciascun campione eseguite mediante procedure di PCR qualitativa specifiche e test POC “FHV-1/*C. felis*/*M. felis* Nucleic Acid” Pluslife, sono stati comparati per ciascun patogeno (Figura 1).

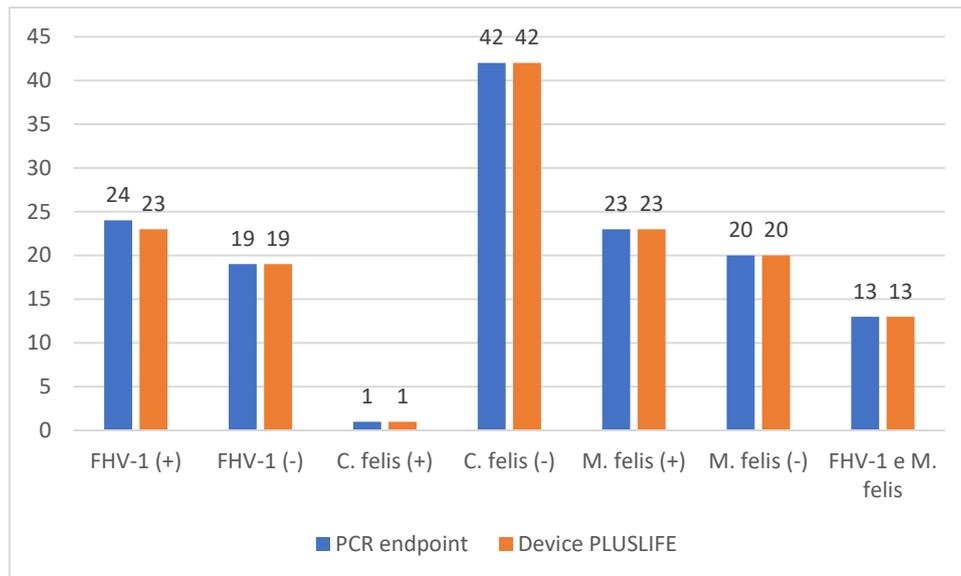


Figura 1- Comparazione dei risultati

Nel dettaglio, è emerso che dei 24 campioni totali positivi alla PCR per FHV-1, 23 sono risultati positivi per FHV-1 anche al test POC Pluslife. La sensibilità calcolata è risultata quindi del 95,8% (23/24). Tutti i campioni negativi in PCR sono risultati negativi anche al test POC Pluslife per il quale la specificità calcolata è risultata del 100% (19/19).

L'unico campione positivo in PCR per *C. felis* è risultato positivo anche al test POC Pluslife (1/1) che ha anche confermato la negatività dei restanti 42 campioni negativi in PCR (42/42), per cui la sensibilità e la specificità sono risultate entrambe del 100%.

Dei 23 campioni totali positivi alla PCR per *M. felis*, è stata confermata la positività di tutti al test POC (23/23) così come è stata confermata la negatività dei 20 campioni negativi (20/20) in PCR per cui anche in questo caso la sensibilità e la specificità sono risultate entrambe del 100%.

Per i 13 campioni che dai risultati della PCR risultavano co-infettati da FHV-1 e *M. Felis*, la co-infezione è stata confermata anche dal test POC Pluslife. Inoltre, sono stati identificati come negativi gli 8 campioni negativi a ciascun patogeno in base ai risultati ottenuti in PCR.

L'accuratezza diagnostica complessiva, calcolata sulla base del numero di campioni in cui entrambe le analisi sono in accordo, è risultata del 97,7% (42/43). Infatti, solo 1 campione degli 11 positivi solo a FHV-1 è risultato negativo al test POC, mentre sono state identificate le corrispondenti positività nei restanti 10, nei 10 positivi solo a *M. felis*, nei 13 co-infettati con FHV-1 e *M. felis* e nell'unico campione positivo a *C. felis*. Inoltre, gli 8 campioni negativi sono risultati negativi anche al test POC Pluslife. I risultati delle prove eseguite in PCR qualitativa e test POC Nucleic acid Pluslife sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1

ID GATTO	PCR			POCT PLUSLIFE		
	FHV-1	<i>C. FELIS</i>	<i>M. FELIS</i>	FHV-1	<i>C. FELIS</i>	<i>M. FELIS</i>
1	+	-	+	+	-	+
2	+	-	+	+	-	+
3	+	-	+	+	-	+
4	+	-	+	+	-	+
5	-	-	+	-	-	+
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	+	+	-	+
8	+	-	-	+	-	-
9	+	-	-	+	-	-
10	+	-	-	+	-	-
11	+	-	-	+	-	-
12	+	-	-	+	-	-
13	+	-	-	+	-	-
14	+	-	+	+	-	+
15	+	-	+	+	-	+
16	+	-	-	+	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	+	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	+	-	-	+
22	-	-	+	-	-	+
23	+	-	-	+	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	+	-	-	+
26	+	-	+	+	-	+
27	-	-	+	-	-	+
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	+	-	-	+
30	-	-	+	-	-	+
31	+	-	+	+	-	+
32	-	-	+	-	-	+
33	-	-	+	-	-	+
34	-	-	+	-	-	+
35	+	-	+	+	-	+
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-
38	+	-	+	+	-	+
39	+	-	-	+	-	-
40	+	-	+	+	-	+
41	+	-	-	+	-	-
42	+	-	+	+	-	+
43	-	-	-	-	-	-

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata valutata la sensibilità e la specificità di un test POC – Feline URI basato sull'identificazione degli acidi nucleici di FHV-1, *C. felis* e *M. felis* mediante device Pluslife Mini Dock. A tal fine, sono stati comparati i risultati ottenuti dall'analisi di 43 campioni respiratori, collezionati da gatti con sintomi clinici riferibili ad URI, eseguita mediante procedure di PCR qualitativa specifiche per FHV-1, *C. felis* e *M. felis*, e i risultati ottenuti dall'analisi degli stessi mediante device Pluslife Mini Dock e test POC "FHV-1/*C. felis*/*M. felis* Nucleic Acid" (Pluslife FCM Card). L'impiego di quest'ultimo ha permesso di identificare il DNA di FHV-1 in 23 dei 24 tamponi risultati positivi in PCR, per cui la sensibilità, intesa come PPA, è risultata del 95,8%. Relativamente all'identificazione del DNA di *C. felis*, la sensibilità calcolata è risultata del 100%, essendo stato identificato come positivo l'unico campione positivo in PCR. Una sensibilità del 100% è stata calcolata anche relativamente all'identificazione del DNA di *M. felis* avendo rilevato la positività per tutti i 23 campioni positivi anche in PCR. Inoltre, dei campioni positivi per FHV-1 e *M. felis*, 13 risultavano co-infettati e sono stati identificati come tali anche dal device Pluslife Mini Dock.

Considerando la specificità, intesa come NPA, tutti i campioni negativi in PCR rispettivamente per FHV-1, *C. felis* e *M. felis* sono risultati negativi al test POC Pluslife per cui è stato calcolato un valore del 100% per tutti e tre i patogeni indagati.

Infine, poiché la concordanza dei risultati è stata confermata per 42 dei 43 campioni testati totali, l'accuratezza diagnostica complessiva è risultata del 97,7%.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti presso il Laboratorio di Malattie Infettive degli Animali del Dipartimento di Medicina Veterinaria (Università degli Studi di Teramo), rispetto alle procedure di PCR qualitativa, il test POC "FHV-1/*C. felis*/*M. felis* Nucleic Acid" eseguito con device Pluslife Mini Dock ha mostrato una differenza tra il valore di sensibilità (95,8%) calcolato relativamente all'identificazione del DNA di FHV-1 (95,7%) e i valori di sensibilità del 100% calcolati per *C. felis* e *M. felis*. Inoltre, per ciascuno dei tre patogeni indagati, sono stati osservati valori di specificità del 100%.

5. BIBLIOGRAFIA

Chalker VJ, Owen WM, Paterson CJ, Brownlie J. Development of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycoplasma felis* in domestic cats. *Vet Microbiol.* 2004 May 20;100(1-2):77-82. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.014.

Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I, Marsilio F. Etiological investigation of multiple respiratory infections in cats. *New Microbiol.* 2007 Oct;30(4):455-61. PMID: 18080682.