

PRC2019008: VALUTAZIONE DELLO STATO SANITARIO DI RATTI E ZEBRAFISH NELL'OTTICA DEL *REFINEMENT* E DELLA *REDUCTION*

Introduzione

Assicurare uno stato sanitario il più possibile controllato e garantire ai ricercatori affidabilità e riproducibilità dei dati sperimentali sono processi di notevole importanza all'interno di uno stabulario.

Lo sviluppo di metodologie molecolari, quale strumento in grado di fornire rapidamente numerose informazioni sullo stato sanitario degli animali stabulati, ha assunto finora un ruolo chiave nell'ottica del principio delle 3Rs (1). Le linee guida FELASA (2) e il decreto legislativo 26/2014 (3) sanciscono l'attuazione di un piano di sorveglianza sanitaria all'interno dell'allevamento sperimentale. La presenza di patogeni nell'ambiente è la principale fonte di malattie e di epidemie per gli animali da laboratorio; queste possono influenzare criticamente il loro stato di salute e di conseguenza la validità e la riproducibilità dei dati sperimentali. Questo studio rientra nei concetti di *Refinement* e *Reduction*. Grazie ad uno screening sanitario dei patogeni, è possibile ottenere un miglioramento delle condizioni sanitarie degli animali e ambientali. Inoltre, è noto dalla letteratura scientifica che l'analisi su campioni ambientali (es. polvere, acqua, segatura, tampone ambientale) consente di ottenere risultati simili a quelli eseguiti su campioni biologici, con l'obiettivo di ridurre il numero di animali sentinella (4).

Lo scopo del lavoro è stato quello di affinare le tecniche per l'estrazione di acidi nucleici da matrici ambientali per la successiva rilevazione di eventuali patogeni circolanti con tecniche di biologia molecolare.

Materiali e metodi

Le matrici ambientali sono state fornite dallo stabulario di IZSLER. Sono stati raccolti campioni di feci, materiale di arricchimento, pelo e segatura. L'estrazione del DNA è stata eseguita con i kit DNeasy PowerSoil, RNeasy PowerSoil DNA Elution, AllPrep DNA/RNA PowerViral, DNA PowerSoil Pro, AllPrep DNA/RNA Mini mentre l'RNA è stato estratto con RNeasy PowerSoil Total RNA, RNeasy PowerSoil DNA Elution, AllPrep DNA /RNA PowerViral, AllPrep DNA/RNA Mini. Tutti i kit sono stati forniti dalla ditta QIAGEN (Milano, Italia). Gli acidi nucleici sono stati quantificati utilizzando il QuantiFluor® ONE dsDNA System e il QuantiFluor® RNA System con il Quantus™ Fluorometer (Promega).

Ectromelia Virus (ECTV) e *Minute Virus of Mice* (MVM) a concentrazioni note (10^1 - 10^2 DC50/ml) sono stati utilizzati per l'infezione diretta di campioni ambientali. Gli acidi nucleici estratti e quantificati sono stati poi amplificati per la ricerca di MVM, ECTV, *Adenovirus murino*, *Polyomavirus murino*, *Mouse Hepatitis Virus* (MHV), *Pneumonia Virus of Mice* (PVM), *Reovirus-3* (REO3) e *Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus* (TMEV).

Per accertare la presenza di virus a livello sistemico, sono stati prelevati campioni di sangue da otto diversi topi e sono stati sacrificati cinque topi da cui sono stati asportati polmoni, cuore, stomaco, intestino, fegato, reni, milza e cervello. Gli organi sono stati frammentati utilizzando l'omogeneizzatore TissueLyser (Qiagen).

Risultati e discussione

Dall'estrazione effettuata sui primi campioni ambientali grezzi, con i kit DNeasy PowerSoil, RNeasy PowerSoil DNA Elution e RNeasy PowerSoil Total RNA, non è stato possibile ottenere una quantità sufficiente di acidi nucleici utili per le successive indagini.

Solo dopo infezione diretta con alte concentrazioni di virus (MVM ed ECTV) è stata ottenuta una piccola quantità di DNA. I valori medi di Cq ottenuti in Real-Time PCR da materiale di arricchimento e pelo riflettono le concentrazioni di DNA estratto. Diversamente, i valori di Cq del campione di segatura mostrano un andamento opposto, probabilmente a causa della complessità della matrice. La scarsa resa ottenuta dal processo di estrazione può dipendere da una bassa presenza di agenti virali nell'ambiente, dalla loro diversa stabilità o dalla specificità dei kit commerciali utilizzati.

Nuovi campioni di feci, materiale di arricchimento, pelo e segatura sono stati raccolti da altre gabbie prima della pulizia settimanale delle stesse. Con i kit AllPrep DNA/RNA PowerViral, DNA PowerSoil Pro e AllPrep DNA/RNA Mini è stato possibile estrarre entrambi gli acidi nucleici dai campioni grezzi; ciò può essere dovuto alla maggiore sensibilità dei kit utilizzati oppure alla raccolta di materiale particolarmente sporco. La ricerca di contaminanti virali, mediante Real-Time PCR, ha dato esito positivo solamente per il virus dell'epatite murina; questo dato è stato confermato con un'ulteriore prova su altri campioni ambientali.

I campioni ematici prelevati da 8 topi diversi provenienti dalle gabbie da cui erano stati raccolti i campioni ambientali, sono risultati tutti negativi al virus MHV mentre tre dei cinque topi sacrificati sono risultati positivi; in particolare in un topo è stato trovato in intestino, stomaco, milza e polmoni, in uno solo nell'intestino e in uno in tutti gli organi prelevati. La sua rilevazione nei campioni di feci è indice del suo particolare tropismo per il tratto gastrointestinale e del suo successivo rilascio nell'ambiente; la presenza invece in altri organi potrebbe dipendere dal politropismo virale.

Questo lavoro preliminare sottolinea come l'utilizzo di matrici ambientali possa essere efficace per assicurare condizioni ambientali controllate e garantire la sorveglianza dello stato di salute degli animali per tutta la durata della loro stabulazione oltre che ridurre l'utilizzo di animali sentinella. Altri campioni saranno testati al fine di affinare le tecniche di campionamento e le fasi di estrazione così da ottenere quantità di materiale utili per i test diagnostici. Si potrà ampliare il pannello diagnostico prendendo in considerazione altre specie virali e anche batteriche per garantire un controllo ancor più specifico e ampio.

Bibliografia

- (1) W.M.S. Russell & R.L. Burch, (1959). *The Principles of Humane Experimental Technique*, xiv + 238 pp. London, UK: Methuen.
- (2) M. Mahler et al., (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory Animals* 48(3) 178-192.
- (3) Italian Legislative Decree 4 marzo 2014, n. 26 "Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici".
- (4) Buxton et al., (2018). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191737.

