

Reazione a catena della polimerasi in tempo reale (real-time PCR) per rilevare il virus della bluetongue in campioni di sangue

Andrea Polci, Cesare Cammà, Sabrina Serini, Luigina Di Gialleonardo, Federica Monaco & Giovanni Savini

Riassunto

In questo lavoro è descritto un metodo RT-PCR real-time per rilevare il virus della bluetongue (BTV) in campioni di sangue. Sono stati utilizzati primer e TaqMan probe specifici per una regione conservata dell'RNA di BTV localizzata sul segmento 5 che codifica per la proteina non strutturale NS1. Il metodo è stato in grado di rilevare virus della bluetongue appartenenti ai sierotipi 2, 4, 9 e 16 isolati in Italia, ed i rispettivi ceppi vaccinali. Il limite di rilevabilità è stato $5,0 \times 10^{-3}$ TCID₅₀ per ml di campione. Non ha amplificato RNA di virus appartenenti al genere *Orbivirus* quali il virus della malattia emorragica epizootica (EHDV) o il virus della peste equina (AHSV) né virus della famiglia *Reoviridae* o virus capaci di indurre quadri clinici simili a quelli causati dal BTV. La sua accuratezza è stata valutata su 104 campioni di sangue in EDTA ed i risultati confrontati con quelli ottenuti con la RT-PCR convenzionale impiegata nella diagnostica di routine. Entrambi i test non hanno evidenziato presenza di BTV in 40 campioni di sangue provenienti da allevamenti indenni alla bluetongue (intervallo di confidenza 95%, 92,5-100%). La real-time ha rilevato presenza di materiale genetico del virus della BTV in 64 bovini sentinella che avevano sieroconvertito ai sierotipi 2 e 16 (intervallo di confidenza 95%, 95,5-100%) al contrario, la RT-PCR convenzionale soltanto in 47 di questi (intervallo di confidenza 95%, 61,5-82,7%) ($P < 0,05$). Il metodo risulta veloce consentendo

di ridurre i tempi di esecuzione e non richiede manipolazioni post-amplificazione contenendo quindi i rischi legati a contaminazioni di prodotti amplificati.

Parole chiave

Diagnosi, Polymerase chain reaction, Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction, Virus della bluetongue.

Introduzione

La febbre catarrale degli ovini, più comunemente conosciuta come bluetongue (BT), è una malattia infettiva non contagiosa ad eziologia virale che colpisce gli ovini ed altri ruminanti domestici e selvatici. Trasmessa da insetti appartenenti al genere *Culicoides* (29), è caratterizzata da febbre, dimagrimento, ulcerazioni e cianosi delle mucose, edema e zoppia. La letalità può essere elevata nelle pecore (5), mentre nelle altre specie l'infezione solitamente decorre in forma asintomatica (3).

Il virus della bluetongue (BTV) appartiene alla famiglia *Reoviridae* e rappresenta il prototipo del genere *Orbivirus* (6, 20). È un virus nudo ad RNA bicatenario il cui genoma è composto di 10 segmenti genici che codificano per sette proteine strutturali (da VP1 a VP7) e quattro non strutturali (NS1, NS2, NS3 e NS3a). Attualmente sono stati identificati 24 sierotipi molti dei quali correlati tra loro, come evidenziato da cross-protezioni *in vivo* e cross-reazioni *in vitro* (8).

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italia
a.polci@izs.it

La febbre catarrale degli ovini è una delle 16 malattie ex lista A dell'Office International des Epizooties (34) ed è causa di notevoli perdite economiche nel comparto zootecnico. Ai costi diretti ed indiretti derivanti dall'infezione, si devono infatti sommare quelli dovuti alle restrizioni imposte alla movimentazione di bestiame e dei loro prodotti nelle nazioni dove la malattia è presente (20, 24, 30). Infezioni da BTV sono state segnalate nelle aree temperate e tropicali di tutto il mondo ma la diffusione della malattia resta limitata alle regioni dove vivono gli insetti vettori competenti per la trasmissione del virus (8, 16). Questi si infettano dopo aver assunto un pasto di sangue da animali viremici e dopo 10-14 giorni sono in grado di trasmettere l'infezione virale in un nuovo ospite (31).

Nel 1998 il virus ha fatto il suo ingresso nel bacino del Mediterraneo e, tra il 1999 ed il 2006, l'infezione ha interessato numerosi Paesi diventando la più estesa e grave epidemia di BT mai riscontrata in Europa. In Italia, sei successive epidemie si sono susseguite tra l'estate del 2000 ed il mese di aprile 2006 con circa 15000 focolai clinici in otto regioni (Abruzzo, Calabria, Campania, Molise, Puglia, Sardegna, Sicilia e Toscana). Nel corso di queste epidemie, caratterizzate da una costante ed intensa espansione del virus verso Nord e dalla contemporanea comparsa di focolai in aree distanti tra loro, sono stati isolati i sierotipi 2, 4, 9 e 16 del virus. Per far fronte alla continua diffusione del virus e proteggere gli animali dall'infezione, le istituzioni sanitarie hanno deciso di vaccinare tutti i ruminanti domestici presenti nelle aree dove era stata dimostrata circolazione virale ed in quelle contigue. Nelle varie campagne vaccinali succedutesi dal 2002, gli animali, a seconda dell'area geografica di appartenenza, sono stati vaccinati con formulazioni vaccinali contenenti uno o più sierotipi virali. Il prodotto impiegato è stato il vaccino vivo attenuato fornito dall'Onderstepoort Biological Product (OBP), Onderstepoort, South Africa. Uno degli eventuali svantaggi associati a questo tipo di vaccinazione è la possibile diffusione del ceppo vaccinale nell'ambiente, evenienza già

peraltro riscontrata per i sierotipi 2 e 16 del vaccino attenuato BT (7, 18). Sulla scorta di quanto esposto, appare quindi evidente come la situazione italiana relativa ai sierotipi virali circolanti sia alquanto articolata e non escluda la presenza dei sierotipi 2, 4, 9 e 16 di origine vaccinale al fianco degli omologhi sierotipi di campo. A render ancor più complesso il panorama vi è il fatto che BTV, per la peculiarità del suo ciclo biologico, con cicli replicativi in cellule di insetto e di ruminante, è continuamente sollecitato a selezioni genetiche che comportano variazioni evolutive più o meno evidenti non solo tra ma anche all'interno di uno stesso sierotipo (25). Pertanto, sebbene a livello sierologico i sierotipi virali circolanti rimangano 4, a livello genetico la possibilità di avere a che fare con 8 varianti virali di BTV non può essere esclusa. Un simile scenario complica notevolmente l'accuratezza e la rapidità delle metodiche diagnostiche soprattutto quelle atte ad evidenziare direttamente il virus. Se è vero che per tutte le malattie è importante poter disporre di test diagnostici in grado di svelare la presenza del virus in tempi rapidi, lo è ancor di più per quelle della ex lista A dell'OIE dove la rapidità diventa elemento cruciale per contenere le drammatiche conseguenze legate alla diffusione di questi patogeni.

In quest'ambito la biologia molecolare ha dato un forte contributo accorciando moltissimo i tempi diagnostici. L'impiego di tecnologie di vario tipo per l'amplificazione degli acidi nucleici (NAT), si è ormai ampiamente diffuso ed affermato in molti settori della diagnostica microbiologica e virologica (21, 27). Ai saggi di tipo qualitativo si affiancano sempre più frequentemente test quantitativi, oggi essenziali nel monitoraggio delle infezioni e delle terapie (12, 14, 17). A scopo diagnostico, sono stati recentemente introdotti numerosi metodi sia di tipo commerciale che "home made", basati su NAT, come la RT-PCR, la nested-PCR, la branched-DNA, la real-time PCR e la PCR-competitiva. Per il virus della BT sono stati sviluppati metodi molecolari basati su RT-PCR (2, 13, 15, 28) che oltre ad una maggior rapidità rispetto ai metodi tradizionali, danno anche la possibilità di

caratterizzare ulteriormente il virus mediante sequenziamento dell'acido nucleico amplificato. Ultimamente sono stati anche disegnati protocolli RT-PCR real-time specifici per alcuni sierotipi BTV circolanti in determinate aree geografiche (11, 33) o per la differenziazione tra alcuni ceppi vaccinali e ceppi di campo del virus (1, 4, 19), o capaci di rilevare tutti i 24 sierotipi BTV di riferimento (32). In questo studio è stato messo a punto un metodo RT-PCR real-time per rilevare i sierotipi di BTV-2, 4, 9 e 16 isolati in Italia e le rispettive varianti vaccinali da campioni di sangue.

Materiali e metodi

Ceppi virali

Il metodo è stato sviluppato su ceppi di BTV appartenenti ai sierotipi BTV-2, 4, 9 e 16 isolati dal reparto di Virologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale", Centro di riferimento OIE per la BT, durante le epidemie di bluetongue verificatesi in Italia tra il 2000 ed il 2004 e sugli omologhi ceppi vaccinali prodotti da OBP ed impiegati nelle campagne di vaccinazione 2002-2005. Prima del loro impiego, i ceppi sono stati propagati su cellule Vero (African green monkey kidney) coltivate in *minimum essentials medium* (MEM) (Eurobio, Francia) contenente L-glutammina, antibiotici (Penicillina 100 UI/ml (Sigma, Germania), Streptomina 100 µg/ml (Sigma), Gentamicina 5 µg/ml (Sigma) e Nistatina 50 UI/ml (Sigma) e 10% di siero fetale bovino (FCS, Sigma). Di ogni ceppo è stato determinato il titolo virale mediante titolazione in micrometodo utilizzando la formula di Reed e Muench (23).

Sviluppo del metodo

Estrazione RNA virale

Dal surnatante delle colture cellulari infettate con BTV e dai ceppi vaccinali, l'RNA totale è stato estratto utilizzando l'High Pure Viral Nucleic Acid extraction kit (Roche, Nutley, New Jersey) a partire da un volume di 200 µl e da un titolo virale di almeno 10⁴TCID₅₀/ml, seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice ed eluendo l'RNA in 50 µl dell'apposito buffer fornito dal kit. Dai campioni di sangue in EDTA l'RNA è stato

estratto così come descritto per i ceppi BTV eccetto che sono stati prelevati 500 anziché 200 µl e, prima dell'estrazione dell'RNA, il sangue è stato lisato aggiungendo 1 ml di acqua fredda e tenendo il campione 10 min in ghiaccio; quindi il campione è stato centrifugato a 16,000 × g per 10 min a 4°C, eliminato il surnatante ed il pellet risospeso in 200 µl di binding buffer.

Sequenziamento

Dall'RNA virale estratto è stato sequenziato il segmento 5 di ogni ceppo, gene che codifica per la proteina NS1. Brevemente, i singoli geni sono stati retrotrascritti e amplificati utilizzando il primer forward 5-AGTTCTCTA GTTGGCAACCACC-3' ed il primer reverse 5'-CTAATACTCCATCCACATCTGAGAC-3'. Il prodotto amplificato è stato purificato con il QIAquick gel purification kit (QIAGEN, Cologne). La reazione di sequenza è stata effettuata impiegando il Big Dye Terminator kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California) e purificata con Montage™ PCR (Millipore, Billerica, Massachusetts). Gli elettroferogrammi, ottenuti utilizzando il DNA Sequencer ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems), sono stati quindi analizzati e le sequenze allineate con i software EditSeq e MegAlign (DNA Star Inc., Madison, Wisconsin).

Real-time RT-PCR "one-step"

Primers e probe sono stati disegnati avvalendosi del software Primer Express (ver. 1.0), (Applied Biosystems). Come modello è stata scelta la sequenza del segmento 5 (Accession Number DQ017960) appartenente al BTV-16 di campo (IT8054/02). La lunghezza totale dell'amplicone è di 81 basi ed i primer forward (5'-TGGCAACCACCAACATGG-3') e reverse (5'-CCAAAAAAGTCCTCGTGGCA-3') individuano una zona del segmento 5 compresa tra i nucleotidi 12 e 93. Il probe TaqMan (6FAM-5'-CGCTTTTGGAGAAAATA CAACATCAGTGGGGAT-3'-TAMRA) è stato marcato all'estremità 5' con 6-carbossi-fluoresceina e all'estremità 3' con 6-carbossi-tetrametil-rodamina ed ibridizza all'interno della zona amplificata dai primer tra i nucleotidi 33 e 65.

La reazione di RT-PCR è stata realizzata in un unico step utilizzando il kit SuperScript™ III RT/Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, California). Nella fase iniziale di denaturazione 5 µl di RNA virale, 2,25 µM di ogni primer ed acqua RNase-free addizionata fino ad un volume di 10 µl sono stati riscaldati a 95°C per 5 min e quindi immersi in ghiaccio. Ad ogni campione sono stati quindi aggiunti: 1X Reaction Mix, 1X ROX Reference Dye, 0,50 µl di SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix, 250 nM del probe TaqMan e acqua RNase-free fino a raggiungere un volume finale di 25 µl. La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata a 50°C per 15 min, seguita da un ciclo di attivazione della Taq polimerasi a 95°C per 2 min e 45 cicli di PCR di 15 sec a 95°C e 30 sec a 60°C. I campioni sono stati analizzati in piastre ottiche per real-time a 96 pozzetti utilizzando lo strumento ABI Prism 7700 ed il software Sequence Detection System (SDS ver. 1.7a), (Applied Biosystems).

Sono stati considerati positivi per BTV tutti i campioni che mostravano un valore del ciclo soglia (threshold Cycle, TC) minore di 40 cicli dopo aver impostato manualmente la soglia di rilevazione a 0,1 secondo le istruzioni del software SDS, ver. 1.7a.

Limite di rilevabilità

Per valutare il limite di rilevabilità del metodo (LOD, limit of detection) sono state allestite diluizioni scalari in base 10 (10^7 - 10^{-3} TCID₅₀/ml) di virus di campo o vaccinali appartenenti ai sierotipi 2, 4, 9 e 16 del virus della BT. Da ognuna di queste diluizioni si è proceduto all'estrazione dell'RNA e quindi alle reazioni di RT-PCR in quadruplicato, utilizzando sia la metodica RT-PCR "one-step" real-time, sia la metodica RT-PCR "one-step" convenzionale (13). Il limite di rilevabilità del metodo è stato valutato come la più alta diluizione in grado di rilevare presenza di BTV in tutte le quattro repliche. Per verificare l'influenza della fase estrattiva sul LOD, sono state esaminate diluizioni scalari in base 10 dell'RNA estratto dal BTV-2 di origine vaccinale con titolo pari a 10^5 TCID₅₀/ml. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti quando la metodica è stata

applicata all'RNA estratto da ognuna delle diluizioni in base 10 dello stesso ceppo virale.

Per vedere quanto la matrice del campione possa aver influenzato la prova, un campione di sangue con EDTA prelevato da una capra sicuramente negativa per BTV è stato diviso in 3 aliquote e ad ogni aliquota sono stati iniettati rispettivamente 6×10^{-1} , 6×10^{-2} e 6×10^{-3} TCID₅₀/ml di BTV-2 IT8341/00. Ciascuna aliquota è stata quindi esaminata 30 volte ed i risultati confrontati con quelli ottenuti quando il metodo è stato applicato alle stesse diluizioni del medesimo ceppo virale.

Specificità

La specificità è stata valutata applicando il metodo ai virus geneticamente correlati con BTV comprendenti il virus della peste equina (AHS) e della malattia emorragica epizootica (EHD), entrambi appartenenti al genere *Orbivirus* e sull'*Orthoreovirus* aviario facente parte, come BTV, della Famiglia dei *Reoviridae*. Ulteriori prove sono state effettuate su virus in grado di indurre quadri clinici sovrapponibili a quello del BTV come il virus dell'ectima contagioso (ORF), quello della diarrea virale bovina (BVD) e della "border disease" (BDV).

Confronto con altri metodi virologici

Per valutarne l'accuratezza, il sistema diagnostico sviluppato è stato esaminato su 104 campioni di sangue in EDTA prelevati tra il 2004 e 2005 da ovini e bovini di diverse regioni italiane (Abruzzo, Emilia, Marche, Sicilia ed Umbria). Di questi, 64 originavano da bovini sentinella che avevano sieroconvertito ai sierotipi 2 (n=62) e 16 (n=2) e 40 da ovini provenienti da allevamenti ovicaprini ubicati in zone ufficialmente indenni alla bluetongue. I risultati sono stati accostati con quelli ottenuti dalla RT-PCR convenzionale, utilizzata routinariamente nei nostri laboratori (18), e con quelli ottenuti dall'isolamento virale (26).

Analisi statistica

Per ogni ceppo virale, i valori di ciclo soglia (Ct) ottenuti per ciascun logaritmo del titolo virale sono stati riportati in assi cartesiani ortogonali. Sono state quindi disegnate le rette che meglio interpolavano i punti del grafico e le rette limite, le rette, cioè, aventi la massima e

la minima pendenza tra tutte quelle che si adattavano a punti del grafico. Per ogni retta oltre al coefficiente di regressione lineare (R) sono stati stimati i valori delle intercette e dei coefficienti angolari (pendenze). I rispettivi intervalli di confidenza al 95% sono stati quindi messi a confronto.

L'efficienza della real-time PCR è stata inoltre determinata mediante la formula $[10^{(-1/pendenza)} - 1]$ mentre la significatività delle eventuali differenze tra i diversi test diagnostici utilizzati così come gli intervalli di confidenza sono stati calcolati usando la distribuzione beta (s+1, n-s+1) dove s, il numero di successi, è il numero totale dei positivi e n, il numero delle prove, è il numero totale degli animali esaminati. Il picco della curva di distribuzione rappresenta il valore più probabile della percentuale degli animali positivi, mentre la larghezza della curva dà informazioni circa l'incertezza della stima dovuta alla dimensione del campione. Per ogni analisi statistica si sono considerate significative differenze con valori di P inferiori a 0,05.

Risultati

Le sequenze ottenute sono state pubblicate su Genbank. Il loro allineamento ha permesso di evidenziare una regione di circa 200 bp, a sequenza conservata per tutti i sierotipi amplificati, situata all'estremità terminale 5', sulla quale è stato possibile disegnare una

coppia di primer e un TaqMan probe (Tabella I).

Il metodo RT-PCR real-time è stato in grado di rilevare tutti i sierotipi del virus della bluetongue considerati, sia quelli isolati dal campo, sia quelli di origine vaccinale (Tabella II). Per ogni ceppo esaminato è stata riscontrata una forte associazione lineare negativa ($R^2 = 0,99$) tra le concentrazioni virali ed il segnale emesso dalla sonda ad ogni ciclo di amplificazione (Fig. 1). Una volta confrontati, gli intervalli di confidenza delle intercette e dei coefficienti angolari di BTV-4 di campo non coincidevano con quelli ottenuti da BTV-2 di campo e vaccinale, indicando che per questi ceppi virali il metodo real-time non presentava le stesse prestazioni (Tabella III). Tuttavia, il fatto che tutti i ceppi virali analizzati in questo studio abbiano mostrato intervalli di confidenza dei coefficienti angolari compresi tra -3,1 e -3,6 dimostra che l'efficienza del metodo RT-PCR real-time è compresa tra il 90% ed il 100%. Si sono ottenute rette di regressione comparabili anche quando sono stati interpolati e confrontati i valori di Ct ottenuti dall'analisi di RNA estratto da diluizioni scalari di BTV-2 di origine vaccinale con quelli ricavati dall'analisi delle diluizioni di RNA estratto da un'unica aliquota, a titolo noto, dello stesso ceppo virale (LOD = 0,01 TCID₅₀/ml, $R^2 = 0,998$) (Fig. 2).

Tabella I

Allineamento della regione 5' del segmento 5 del virus della bluetongue (BTV) e localizzazione dei primers e probe

BTV isolato	Codice d'accesso GenBank	Risultati real-time RT-PCR Sequenza 5'-3'	Posizione sequenza primer 5'12-30	Posizione TaqMan probe 33-65	Posizione 3' primer 74-93
		TGGCAACCAC CAAACATGG		CGCTTTTIGAGAAAATAC AACATCAGTGGGGAT	TGCCACGAGGACT TTTTGG
BTV2IT8341/00	DQ017956	+	-----	-----	-----A-----
BTV4IT3036/03	DQ017958	+	-----	-----	-----A-----
BTV4vaccineOBP	DQ017957	+	-----	-----	C-----A-----
BTV9IT12217/00	DQ017959	+	-----	-----	-----A-----
BTV9vaccineOPB	DQ017962	+	-----	-----	-----A-----
BTV16IT8054/02	DQ017960	+	-----	-----	-----
BTV16vaccOBP	DQ017961	+	-----	-----	-----A-----
BTV2vaccineOBP	AY138895	+	-----	-----	-----

BTV virus della bluetongue
RT-PCR reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Tabella II

Limiti di rilevabilità del metodo real time RT-PCR e parametri della retta di correlazione ottenuti da diluizioni scalari di surnatante di tessuto colture infette con il virus della bluetongue. Le rette di correlazione sono state calcolate riportando in ordinata il valore di Ct ed in ascisse il corrispondente logaritmo del titolo virale. L'efficienza di RT-PCR è stata calcolata secondo la formula $E=10^{[-1/m]-1}$

Ceppo BTV	Limite di rilevabilità TCID ₅₀ /ml	Coefficiente di correlazione R ²	Efficienza RT-PCR
BTV-2 vaccino	0,05	0,999	88%
BTV-4 vaccino	0,02	0,991	101%
BTV-9 vaccino	0,05	0,998	96%
BTV-16 vaccino	0,01	0,996	86%
BTV-2 IT8341/00	0,05	0,995	86%
BTV-4 IT9034/03	0,01	0,997	99%
BTV-9 IT12217/00	0,05	0,998	91%
BTV-16 IT8054/02	0,005	0,990	95%

BTV virus della bluetongue
TCID tissue culture infective dose
RT-PCR reverse transcriptase-polymerase chain reaction

I limiti di rilevabilità del metodo RT-PCR real time hanno fluttuato tra 0,005 a 0,05 TCID₅₀/ml, in funzione del ceppo virale esaminato. Al contrario la RT-PCR convenzionale ha fornito valori di LOD generalmente più elevati e compresi in un intervallo di variabilità notevolmente più ampio oscillante tra 0,025 TCID₅₀/ml per BTV-4 di origine vaccinale e 10^{3,7}TCID₅₀/ml per BTV-9 di campo (Tabella IV).

Le prove effettuate sui 3 gruppi di campioni di sangue infettati sperimentalmente con BTV-2 di campo hanno dato rispettivamente il 100% (intervallo di confidenza 95%, 90,8-100%) di positività al titolo virale di 0,63 TCID₅₀/ml, il 60% (intervallo di confidenza 95%, 42,2-75,5%) di positività al titolo virale di 0,06 TCID₅₀/ml e solo il 10% (intervallo di confidenza 95%, 3,6-25,7%) di positività al titolo virale di 0,006 TCID₅₀/ml. Il metodo non ha amplificato gli acidi nucleici dei virus geneticamente

correlati al BTV così come quelli dei virus che causano quadri clinici simili alla BT.

Tutti e tre i test impiegati in questo studio non hanno evidenziato presenza di BTV nei 40 campioni di sangue provenienti da allevamenti indenni alla bluetongue (intervallo di confidenza 95%, 92,5-100%). La real-time PCR ha rilevato presenza di materiale genetico del virus della BTV in tutti i bovini sentinella (intervallo di confidenza 95%, 95,5-100%) al contrario, la RT-PCR soltanto in 47 (intervallo di confidenza 95%, 61,5-82,7%) (P<0,05). Da 4 campioni è stato isolato il virus della bluetongue, tre ceppi sono stati tipizzati come BTV-2 ed 1 come BTV-16.

Discussione

Le recenti epidemie di BT che hanno interessato il bacino del Mediterraneo, ed in particolare l'Italia, hanno evidenziato la necessità di disporre di un test diagnostico automatizzabile in grado non solo di processare un gran numero di campioni in tempi rapidi, ma anche capace di individuare tutte le varianti del virus che hanno circolato e circolano in Italia dal 2000, con livelli di sensibilità e specificità comparabili se non superiori a quelli dei test attualmente in uso in laboratorio. L'utilizzo delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici in diagnostica molecolare è ormai considerato universalmente il "gold standard" per quanto riguarda l'identificazione di target genomici in campioni biologici con elevatissima sensibilità e specificità ed è divenuto uno strumento essenziale per tutti i laboratori di analisi (14). In particolare la real-time PCR (9, 10) è un modello innovativo di PCR quantitativa, con enormi potenzialità rispetto alla PCR "vecchio stile" per la flessibilità diagnostica e la rapidità di risultati, che ne fa uno strumento estremamente importante non solo per la diagnostica di routine ma anche per l'identificazione di nuovi patogeni. Non prevedendo una fase di rilevazione al termine del processo amplificativo, l'iter analitico rispetto alla RT-PCR convenzionale è notevolmente ridotto e, dal momento che la rilevazione del prodotto di amplificazione

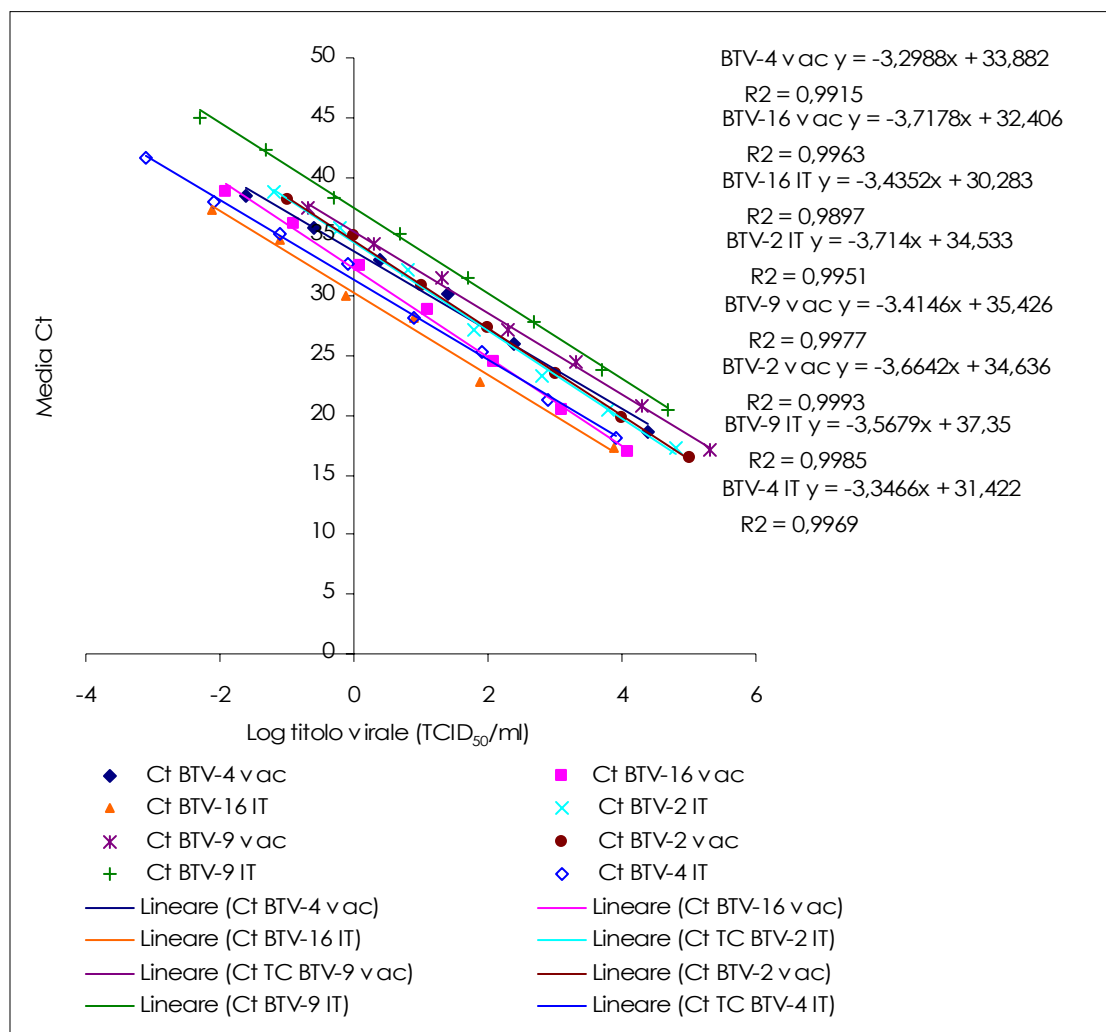


Figura 1
Rette di correlazione ottenute interpolando i valori di Ct ottenuti dall'analisi dell'RNA estratto da diluizioni scalari dei ceppi del virus della bluetongue di campo appartenenti ai sierotipi 2,4, 9 e 16 e dei rispettivi ceppi vaccinali

Tabella III

Stima dell'intervallo di confidenza al 95% calcolato per l'intercetta ed il coefficiente angolare delle rette di regressione dei ceppi del virus della bluetongue esaminati

Ceppo	Intercetta	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)	m	Limite inferiore (95%)	Limite superiore (95%)
BTV-16 campo	30,661	30,314	31,008	-3,435	-3,602	-3,269
BTV-4 campo	31,756	31,518	31,995	-3,347	-3,448	-3,245
BTV-16 vaccinale	31,964	31,622	32,306	-3,693	-3,846	-3,540
BTV-4 vaccinale	32,722	31,977	33,468	-3,374	-3,732	-3,016
BTV-9 vaccinale	34,402	34,114	34,690	-3,415	-3,516	-3,313
BTV-2 vaccinale	34,636	34,344	34,928	-3,664	-3,768	-3,561
BTV-2 campo	35,276	34,778	35,773	-3,714	-3,890	-3,538
BTV-9 campo	38,685	37,969	39,400	-3,654	-3,902	-3,405

BTV virus della bluetongue

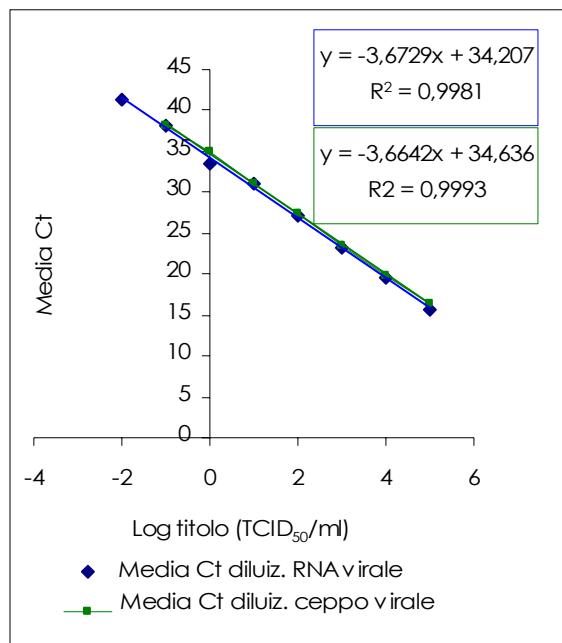


Figura 2
Rette di correlazione ottenute interpolando i valori di Ct generati dall'analisi dell'RNA estratto da diluizioni scalari del ceppo virale BTV2 di origine vaccinale e quelli ottenuti da diluizioni dell'RNA estratto da un'unica aliquota, a titolo noto, dello stesso ceppo virale

Tabella IV
Comparazione delle soglie di rilevabilità ottenute con il metodo RT-PCR "one-step" standard e Real-time RT-PCR

Sierotype	Soglia di rilevabilità (TCID ₅₀ /ml)	
	Real-time RT-PCR	RT-PCR 'one-step' convenzionale
BTV-2 campo	0,05	10 ^{1.4}
BTV-2 vaccinale	0,05	0,1
BTV-4 campo	0,01	2,5
BTV-4 vaccinale	0,02	0,025
BTV-9 campo	0,05	10 ^{3.7}
BTV-9 vaccinale	0,05	0,2
BTV-16 campo	0,005	10 ^{2.4}
BTV-16 vaccinale	0,01	10 ^{2.1}

BTV virus della bluetongue
TCID tissue culture infective dose
RT-PCR reverse transcriptase-polymerase chain reaction

avviene durante i cicli di PCR, il processo d'analisi è facilmente automatizzabile. Il suo impiego nel settore diagnostico virale è andato via via crescendo. Nella diagnosi della BT, le real-time fin qui proposte, sebbene abbiano dato risultati incoraggianti, palesano tuttavia limiti applicativi in quanto valide solamente per alcuni sierotipi e pertanto adatte a scenari epidemiologici circoscritti. Di fatto non esistono metodi RT-PCR real-time, che siano stati formalmente validati, in grado di rilevare tutti i 24 sierotipi di BTV in condizioni di campo. Ne consegue che, l'applicabilità di ogni protocollo deve essere di volta in volta esaminata nelle differenti situazioni epidemiche presenti in una determinata area geografica, dal momento che è potenzialmente sufficiente un solo mismatch nucleotidico nella regione di ibridizzazione del probe per ridurre drasticamente la sensibilità del metodo (11).

Nella recente epidemia di BT, l'Italia per la particolare posizione geografica è stata interessata dalle incursioni dei sierotipi 2, 4, 9 e 16 del virus della BT. Le conseguenti campagne vaccinali con la possibile diffusione nell'ambiente degli omologhi ceppi vaccinali hanno complicato il quadro epidemico tanto che non è da escludere la possibilità che il territorio italiano, unico tra i paesi del bacino mediterraneo, sia interessato dalla circolazione di 8 diverse varianti virali del virus della BT. In un contesto simile si è dovuto pertanto, disegnare un protocollo di real time *ad hoc* in grado di soddisfare le particolari esigenze diagnostiche dal momento che la RT-PCR real-time messa a punto recentemente da Jiménez-Clavero et al. (11) non era in grado di identificare i ceppi virali BTV-16 di origine vaccinale ed il ceppo BTV-9 di campo isolato in Italia (dati non mostrati). Quale target della reazione di amplificazione si è deciso, per l'elevato grado di conservazione nei diversi sierotipi, di utilizzare il segmento 5 (2, 33).

Per ridurre i tempi di esecuzione la reazione di RT-PCR è stata eseguita in un unico step ed in fase di estrazione l'*high pure viral nucleic acid kit* è stato preferito al Trizol, già utilizzato nella RT-PCR one-step, che tuttavia non garantiva un sufficiente grado di purezza dell'RNA estratto e non permetteva l'automazione del

processo di estrazione. Il sistema real-time così sviluppato è stato in grado di rilevare in un breve lasso di tempo (non più di 4 ore) tutti i sierotipi esaminati con limiti di rilevabilità comparabili raggiungendo soglie di gran lunga superiori a quelle ottenute con la RT-PCR usata nella routine diagnostica. A seguito di prove preliminari il metodo si è dimostrato in grado di identificare anche i sierotipi 1, 8, 13, 14 e 19 (dati non mostrati).

La miglior sensibilità è stata confermata anche dal maggior numero di campioni di sangue positivi correttamente identificati, sebbene appartengano tutti ai sierotipi 2 e 16, e questo nonostante vi fossero differenze in uno o due nucleotidi tra il primer reverse e la sequenza di RNA virale complementare (Tabella I). I risultati confermano quanto osservato in precedenza e cioè che mentre differenze anche di un solo nucleotide nella zona di ibridizzazione del probe possono portare ad una drastica perdita di sensibilità del metodo, le differenze di uno o due nucleotidi sulle sequenze dei primers sembrano essere meno penalizzanti (11). Gli elevati valori di efficienza della RT-PCR rilevati (>86%) ribadiscono la buona accuratezza e riproducibilità della prova. Quanto più il suo valore è vicino al 100% tanto più i risultati sono accurati e riproducibili. Il valore è influenzato dalla lunghezza dell'amplicone, dal suo contenuto in G/C nonché dalla sua struttura secondaria. Dipende inoltre dalla dinamica della reazione e variazioni possono essere dovute agli enzimi usati o a concentrazioni non ottimali dei reagenti (22).

La scelta di effettuare la reazione di RT-PCR in un unico step non ha penalizzato la sensibilità e l'efficienza della reazione (Tabella II) mentre l'omologia delle rette di regressione derivate dall'interpolazione dei valori di Ct ottenuti a partire da diluizioni scalari dell'RNA virale e da quelli derivati da diluizioni scalari del ceppo virale (Fig. 2), comprova che il processo di estrazione utilizzato non ha influenzato la sensibilità del metodo. Oltre ad evidenziare un'elevata sensibilità, il metodo, non amplificando alcuna sequenza nucleotidica dei

ceppi virali geneticamente correlati (AHS, EHD e reovirus aviari) e di quelli in grado di evocare quadri clinici sovrapponibili a quello della bluetongue, si è mostrato non solo altamente specifico ma anche prezioso nella diagnosi differenziale con malattie quali l'ORF, la BDV e la BVD.

L'efficacia diagnostica della real-time è stata ulteriormente suffragata quando il metodo è stato saggiato su campioni di sangue infettati artificialmente dove l'RNA virale, similmente a quanto avviene in campo, si trova in un mezzo più o meno ricco di acidi nucleici di origine cellulare. Anche in questa circostanza la real-time PCR è stata in grado di rilevare concentrazioni virali simili (6×10^{-3} TCID₅₀/ml) a quelle riscontrate quando applicata sui ceppi virali. Alla concentrazione di 0,06 TCID₅₀/ml il 60% dei campioni esaminati sono risultati positivi per BTV con un valore medio del ciclo soglia di $37,8 \pm 0,6$ cicli. Non sono state riscontrate differenze significative anche quando il metodo è stato applicato a campioni di sangue prelevato da bovini, capre o pecore (G. Savini, comunicazione personale). In riferimento a questi risultati è importante considerare il vantaggio offerto dalla metodica real-time rispetto alle RT-PCR convenzionali quando le quantità di RNA virale target sono vicine ai limiti di rilevabilità del metodo. Mentre nelle PCR convenzionali è infatti necessaria una lettura visiva della banda di acido nucleico amplificato nel gel per l'interpretazione del risultato qualitativo finale, per cui si ha una valutazione soggettiva del risultato positivo, nel caso della PCR real-time, il risultato viene espresso quantitativamente in modo oggettivo. Inoltre, poiché in questa metodica la rilevazione dell'acido nucleico avviene durante i cicli di amplificazione, senza aver bisogno di ulteriori manipolazioni del prodotto, questo sistema d'analisi riduce notevolmente i rischi di contaminazioni dovuti ai prodotti amplificati che spesso possono essere ulteriore fonte di dubbi interpretativi del risultato nei sistemi di PCR convenzionali ed in particolar modo nelle metodiche di nested-PCR.

Conclusioni

Il metodo RT-PCR real-time messo a punto ha rilevato tutti i sierotipi di BTV presenti in Italia, compresi quelli di origine vaccinale ed il sierotipo 1 che è circolato di recente nella penisola ellenica. Ha i requisiti adatti per monitorare la diffusione del virus in corso di focolai o per essere impiegato come test di screening prima di procedere con metodiche più lunghe e costose. Dato che la presenza di acido nucleico virale non è indicativa di una viremia in atto (31) è consigliabile comunque confermare il risultato con l'isolamento virale. Inoltre, in considerazione della continua evoluzione del virus e della possibile insorgenza di nuovi ceppi BTV in Italia, il test, così come è stato progettato, richiede una costante verifica. Il suo continuo utilizzo, parallelamente all'uso di altri test virologici, fornirà le informazioni aggiuntive sulla sua sensibilità e specificità diagnostica relativamente ai ceppi virali di BTV circolanti in Italia.

Non ultimo, tra i vantaggi del metodo, rispetto alle RT-PCR convenzionali, è importante menzionare la capacità di quantizzare gli acidi nucleici e la possibilità di rilevare più target nella stessa reazione di amplificazione (multiplexing). Il poter lavorare in multiplexing consentirebbe un controllo costante di tutto il processo d'analisi includendo tra i campioni in esame un target virale esogeno a concentrazione nota (*internal positive control*: IPC). L'individuazione e l'ottimizzazione di un opportuno IPC da amplificare contemporaneamente all'acido nucleico virale target, permetterebbe infatti di rilevare eventuali false reazioni imputabili alla scarsa qualità dell'RNA estratto o a fenomeni di inibizione della reazione di PCR.

Quindi tra gli obiettivi futuri di miglioramento del metodo avranno la precedenza la scelta e l'ottimizzazione di un idoneo IPC ed la verifica della capacità della RT-PCR real-time di riconoscere tutti i 24 sierotipi del BTV.

Bibliografia

1. Agüero M., Arias M., Romero L.J., Zamora M.J. & Sanchez-Vizcaíno J.M. 2002. Molecular differentiation between NS1 gene of a field strain bluetongue virus serotype 2 (BTV-2) and NS1 gene of an attenuated BTV-2 vaccine. *Vet Microbiol*, **86**, 337-341.
2. Aradaib I.E., Smith W.L., Osburn B.I & Cullor J.S 2003. A multiplex PCR for simultaneous detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viruses. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **26**, 77-87.
3. Barratt-Boyes S.M. & MacLachlan N.J. 1995. Pathogenesis of bluetongue virus infection of cattle. *J Am Vet Med Assoc*, **206**, 1322-1327.
4. Bréard E., Sailleau C., Coupier H., Mure-Ravaud K., Hammoumi S., Gicquel B., Hamblin C., Dubourget P. & Zientara S. 2003. Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet Res*, **34**, 777-789.
5. Erasmus B.J. 1975. Bluetongue in sheep and goats. *Aust Vet J*, **51**, 165-170.
6. Erasmus B.J. 1990. Bluetongue. In *Virus infections of ruminants*, Vol. 3 (Z. Dinter & B. Morein, eds). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 227-237.
7. Ferrari G., De Liberato C., Scavia G., Lorenzetti R., Zini M., Farina F., Magliano A., Cardati G., Sholl F., Guidoni M., Scicluna M.T., Amaddeo D., Scaramozzino P. & Autorino G.L. 2005. Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev Vet Med*, **68**, 10-13.
8. Gibbs E.P.J. & Greiner E.C. 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, **17**, 207-220.
9. Gibson U.E.M., Heid C.A. & Williams P.M. 1996. A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, **6**, 995-1001.
10. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J. & Williams P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, **6**, 986-994.

11. Jiménez-Clavero M.A., Agüero M., San Miguel E., Mayoral T., Cruz López M., Ruano M.J., Romero E., Monaco F., Polci A., Savini G. & Gómez-Tejedor C. 2006. High throughput detection of bluetongue virus by a new real-time on clinical samples from current Mediterranean outbreaks. *J Vet Diagn Invest*, **18**, 7-17.
12. Jung R., Soondrum K. & Neumaier M. 2000. Quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med*, **38**, 833-836.
13. Katz J.B., Gustafson G.A. Alstad A.D., Adler K.A. & Moser K.M. 1993. Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep, using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. *Am J Vet Res*, **54**, 2021-2026.
14. Mackay I.M., Arden K.E. & Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acid Res*, **30** (6), 1292-1305.
15. McColl K.A. & Gould A.R. 1991. Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res*, **21**, 19-34.
16. Mellor P.S. 1990. The replication of bluetongue virus in *Culicoides* vectors. *Curr Top Microbiol Immunol*, **162**, 143-161.
17. Metwally M.A., Roberts L.R., Petrovic L.M., Zein C.O., Montoya P. & Zien N.N. 2002. Previous and silent hepatitis B infection in patients with chronic hepatitis C: risk factors for severe hepatic fibrosis. *Hepatology*, **36**, Pt 2, 161.
18. Monaco F., Cammà C., Serini S. & Savini G. 2006. Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue virus serotype 16. *Vet Microbiol*, **116**, 45-52.
19. Orrù G., De Santis P., Solinas F., Savini G., Piras G. & Caporale V. 2004. Differentiation of Italian field and South African vaccine strains of bluetongue virus serotype 2 using real-time PCR. *J Virol Methods*, **122**, 37-43.
20. Osburn B.I. 1994. Bluetongue virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **10**, 547-560.
21. Pyke A.T., Smith I.L., Van den Hurk A.F., Northill J.A., Chuan T.F., Westacott A.J. & Smith G.A. 2004. Detection of Australian Flavivirus encephalitic viruses using rapid fluorogenic TaqMan RT-PCR assays. *J Virol Methods*, **117**, 161-167.
22. Rasmussen R. 2001. Quantification on the lightcycler. In *Rapid cycle real time PCR, methods and applications* (S. Meuer., C. Wittwer. & K. Nakagawara, eds). Springer Verlag, Berlin, 21-34.
23. Reed L.J. & Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, **27**, 493-497.
24. Roberts D.H., Lucas M.H. & Bell R.A. 1993. Animal and animal product importation and the assessment of risk from bluetongue and other ruminant orbiviruses. *Br Vet J*, **149**, 87-99.
25. Roy P., Marshall J.J.A. & French T.J. 1990. Structure of bluetongue virus genome and its encoded proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **162**, 43-87.
26. Savini G., Goffredo M., Monaco F., Di Gennaro A., Cafiero M.A., Baldi L., De Santis P., Meiswinkel R. & Caporale V. 2005. Bluetongue virus isolations from midges belonging to the *Obsoletus* complex (*Culicoides*, Diptera: *Ceratopogonidae*) in Italy. *Vet Rec*, **157**, 133-139.
27. Schwaiger M. & Cassinotti P. 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol*, **27**, 136-145.
28. Shad G., Wilson W.C., Mecham J.O. & Evermann J.F. 1997. Bluetongue virus detection: a safer reverse transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep. *J Vet Diagn Invest*, **9**, 118-124.
29. Spruell J. 1905. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *J Comp Pathol Ther*, **18**, 321-337.
30. Suttmoller P. & Wrathall A.E. 1977. A quantitative assessment of the risk of transmission of foot-and-mouth disease, bluetongue and vesicular stomatitis by embryo transfer in cattle. *Prev Vet Med*, **32**, 111-132.
31. Tabachnick W.J. 1996. *Culicoides variipennis* and bluetongue-virus epidemiology in the United States. *Annu Rev Entomol*, **41**, 23-43.

32. Toussaint J.F., Sailleau C., Bréard E., Zientara S., De Clercq K. 2006. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J Virol Meth*, doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.007.
33. Wilson W.C., Stallknecht D.E. & Mecham J.O. 2004. Field-deployable real-time polymerase chain reaction detection of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viral ribonucleic acid. *In* Bluetongue, Part II (N.J. MacLachlan & J.E. Pearson, eds). Proc. Third International Symposium, Taormina, 26-29 October 2003. *Vet Ital*, **40**, 587-593.
34. World Organisation for Animal Health (OIE: Office International des Épizooties) 2004). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th Ed. OIE, Paris (www.oie.int/eng/publicat/en_standards.htm ultimo accesso 30 novembre 2006).