



Nuovo metodo Real time RT-PCR Bluetongue Virus

- Nel 2008 in Svizzera viene isolato un nuovo *Orbivirus* nelle capre, denominato Toggenburg (TOV), che è stato proposto come sierotipo 25 del virus Bluetongue (Hofmann et al., 2008).
- Nel 2010 in Kuwait viene isolato un nuovo *Orbivirus*, in pecore e capre, denominato KUW2010, che è stato proposto come sierotipo 26 del virus Bluetongue (Maan et al., 2011).

- Il sequenziamento del genoma dei due nuovi *Orbivirus* ed il confronto con altri *Orbivirus* hanno evidenziato un alto livello di identità di sequenza con il virus Bluetongue.
- Il sequenziamento del segmento 2 (VP2) ha evidenziato un basso livello di identità nt/aa con i precedenti sierotipi BTV, tale da rappresentare due nuovi sierotipi BTV-25 e BTV-26
- Tra le sequenze del segmento 2 dei sierotipi BTV-25 e BTV-26 è stato rilevato un livello di identità nt/aa di 63.9% / 61.5%.

- Alcuni metodi Real time RT-PCR in uso per la ricerca del virus della Bluetongue sono stati sviluppati disegnando primer e probe per una regione conservata del RNA segmento 10 (NS3) del BTV (Orrù et al, 2006) oppure per RNA segmento 5 (NS1) del BTV (Polci et al., 2007).
- Capacità di rivelare 24 sierotipi (1°-24°) BTV, ma non il 25° e il 26° sierotipo BTV.
- Una versione modificata dei primer già utilizzati per RNA segmento 10 (NS3) (Orrù et al, 2006) e una nuova probe sono stati utilizzati per una nuova Real time RT-PCR in grado di rivelare anche i sierotipi 25 e 26 del BTV (Hofmann et al., 2008).

- Estrazione RNA BTV : High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche).
- Controllo di processo (IPC): Armored RNA West Nile Virus (HNY1999) (Asuragen, Inc.).
- Master mix: SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen).
- Strumento Real-time: 7900HT Fast Real-Time PCR System” (Applied Biosystems).

Real time RT-PCR BTV: primer e probe

- NS3-BTV:

NS3-BTV-Fwd: **5'-TGG AYA AAG CRA TGT CAA A-3'**

NS3-BTV-Rev: **5'-ACR TCA TCA CGA AAC GCT TC-3'**

NS3-BTV-P: **FAM 5'-ARG CTG CAT TCG CAT CGT ACG C-3' BHQ1**

- IPC:

NS5-2-Fwd: **5'-GAA GAG ACC TGC GGC TCA TG-3'**

NS5-2-Rev: **5'-CGG TAG GGA CCC AAT TCA CA-3'**

NS5-2-P: **VIC 5'-CCA ACG CCA TTT GCT CCG CTG-3' TAMRA**

Real time RT-PCR BTV: denaturazione RNA_{ds}

	Conc. stock	μL/reazione
NS3-BTV-Fwd	20 μM	0,5
NS3-BTV-Rev	20 μM	0,5
H ₂ O		4
RNA		2
	Volume reazione	7

95° C x 5', in ghiaccio per 5'

Real time RT-PCR BTV: Master mix

	Conc. stock	μL/reazione
H ₂ O		6,11
2X Reaction Mix	2X	12,5
ROX Reference Dye	50X	0,50
Mg ₂ SO ₄	50 mM	1,00
NS3-BTV-P	5 μM	1,00
NS5-2-Fwd	50 μM	0,10
NS5-2-Rev	50 μM	0,10
NS5-2-P	20 μM	0,19
SS III RT Platinum Taq Mix		0,5
RNA denaturato		3
	Volume reazione	25

Real time RT-PCR BTV: profilo termico

RT	48°C	30 min.
Att. Taq Polimerasi	95°C	2 min.
50 cicli	95°C	15 sec.
	56°C	30 sec.
	72° C	30 sec.

Valutazione del metodo Real time RT-PCR BTV

- Confronto tra Real time RT-PCR BTV (Polci et al., 2007) e Real time RT-PCR BTV (Hofmann et al., 2008).
- Sierotipi BTV titolati (TCID₅₀/mL).
- Determinazione LOD (TCID₅₀/mL).
- Analisi campioni di sangue di campo.

Real time RT-PCR BTV: risultati LOD

			Real Time RT-PCR BTV (LOD)	
sierotipo BTV	Lotto	TCID ₅₀ /ml	Hofmann, 2008 (Ct < 50)	Polci, 2007 (Ct ≤ 38)
BT 1	3/11	10 ^{6,95}	10 ^{0,95} (Ct= 45,4)	10 ^{1,95} (Ct= 36,9)
BT 2	4/11	10 ^{6,72}	10 ^{0,72} (Ct= 42,6)	10 ^{1,72} (Ct= 34,5)
BT 3	1/11	10 ^{6,88}	10 ^{2,88} (Ct= 41,9)	10 ^{3,88} (Ct= 32,9)
BT 4	8/11	10 ^{7,38}	10 ^{3,38} (Ct= 41,0)	10 ^{5,38} (Ct= 28,0)
BT 5	1/12	10 ^{7,06}	10 ^{2,06} (Ct= 41,6)	10 ^{3,06} (Ct= 34,4)
BT 6	2/11	10 ^{7,30}	10 ^{1,30} (Ct= 40,2)	10 ^{2,30} (Ct= 35,5)
BT 7	1/11	10 ^{6,86}	10 ^{0,86} (Ct= 42,8)	10 ^{1,86} (Ct= 36,8)
BT 8	7/11	10 ^{7,49}	10 ^{1,49} (Ct= 42,8)	10 ^{2,49} (Ct= 37,0)
BT 9	1/12	10 ^{7,80}	10 ^{2,80} (Ct= 34,1)	10 ^{2,80} (Ct= 33,6)
BT 10	2/10	10 ^{6,66}	10 ^{0,66} (Ct= 39,9)	10 ^{2,66} (Ct= 37,1)
BT 11	1/11	10 ^{6,01}	10 ^{0,01} (Ct= 41,3)	10 ^{2,01} (Ct= 33,5)
BT 12	1/11	10 ^{6,30}	10 ^{0,30} (Ct= 42,6)	10 ^{1,30} (Ct= 35,8)
BT 13	2/10	10 ^{5,25}	10 ^{0,25} (Ct= 39,6)	10 ^{1,25} (Ct= 32,9)
BT 14	1/10	10 ^{6,90}	10 ^{0,90} (Ct= 42,4)	10 ^{3,90} (Ct= 30,6)
BT 15	3/11	10 ^{6,47}	10 ^{0,47} (Ct= 41,2)	10 ^{3,47} (Ct= 36,3)
BT 16	3/11	10 ^{6,80}	10 ^{1,80} (Ct= 40,2)	10 ^{1,80} (Ct= 37,2)
BT 17	2/10	10 ^{5,16}	10 ^{0,16} (Ct= 37,7)	10 ^{0,16} (Ct= 32,6)
BT 18	2/10	10 ^{5,31}	10 ^{0,31} (Ct= 38,8)	10 ^{0,31} (Ct= 36,1)
BT 19	1/11	10 ^{7,22}	10 ^{1,22} (Ct= 43,8)	10 ^{2,22} (Ct= 34,2)
BT 20	3/10	10 ^{7,06}	10 ^{0,06} (Ct= 41,2)	10 ^{2,06} (Ct= 31,9)
BT 21	1/11	10 ^{5,80}	10 ^{0,80} (Ct= 38,6)	10 ^{2,80} (Ct= 32,6)
BT 22	2/10	10 ^{5,31}	10 ^{0,31} (Ct= 40,7)	10 ^{2,31} (Ct= 32,1)
BT 23	2/10	10 ^{4,43}	10 ^{0,43} (Ct= 46,0)	10 ^{0,43} (Ct= 36,1)
BT 24	2/10	10 ^{5,28}	10 ^{0,28} (Ct= 43,6)	10 ^{0,28} (Ct= 34,6)
BT 25			confermato da IAH Pirbright	N.D.
BT 26	1/12	10 ^{5,80}	10 ^{0,80} (Ct=40,3)	N.D.

Real time RT-PCR BTV: risultati campioni di sangue

		Hofmann et al., 2008		
		+	-	
Polci et al., 2007	+	62		62
	-	67	103	170
Totale		129	103	232

Specificità relativa: 100%
Sensibilità relativa: 48,1%
Indice Kappa ($p < 0.05$): 0,45
Significatività di Kappa: *significativo*

Conclusioni

- Rivelazione di tutti i 26 sierotipi di BTV.
- Maggiore sensibilità.
- Capacità di rivelare campioni border.
- Validazione Laboratori di Riferimento OIE con ceppi di riferimento e con tutti i ceppi disponibili in laboratorio.
- Proposto dai Laboratori di Riferimento come metodo raccomandato dall'OIE.
- Addestramento.



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO



Reference Laboratory
Bluetongue

Grazie