

RICERCA DEL VIRUS WEST NILE MEDIANTE REAL TIME RT-PCR PER IL GENE CODIFICANTE LA PROTEINA NON STRUTTURALE (NS2a)

Cersini A., Ciabatti I.M., Damiani A., Manna G., Letizia E., Denisi A., Scicluna M.T., Autorino G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Centro di Referenza per le Malattie degli Equini: Direzione Operativa Diagnosi delle Malattie Virali, Ufficio Virologia Speciale e Biotecnologie, Via Appia Nuova 1411, Roma

Key Words: West Nile Virus, Real Time PCR, NS2a gene

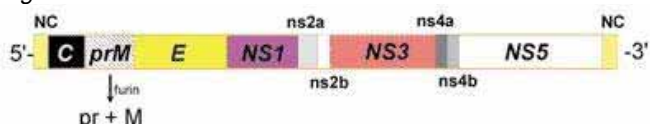
Abstract

Phylogenetic analysis distributes WNV strains from different origins within four lineages. Diagnosis of WNV infections can be carried out by serological, immunohistochemical, histological and molecular methods. Different real time RT PCR specific for the 3' non coding (NC) genome region, the E and the NS5 genes have been developed. Within a project working on diagnostic tools for viral equine diseases, we developed a real time RT PCR targeting an area of the gene mainly present in NS2a, containing a conserved region of WNV. Our assay resulted more sensitive than the one targeting NC, detecting also a reference strain belonging to the lineage 2 (WNV B956). Specificity was assessed positively by testing the method toward Borna virus (BDV) and Equine herpesvirus type 1 (EHV1), both present in the European equine population. To define the efficiency of the method an mRNA-NS2a was synthesized, which could usefully be employed as a non hazardous positive control in diagnostic routine.

Introduzione

Nell'ambito del progetto di ricerca "Sviluppo di metodi diagnostici per la sorveglianza delle neuropatologie di origine virale degli equini" sono stati sviluppati metodi analitici per la diagnostica di alcune delle encefalomieliti virali a maggior rischio di diffusione nel continente europeo. Un'altro degli obiettivi del progetto era anche la preparazione di reagenti a basso rischio biologico. Fra gli agenti responsabili di possibili casi di encefalomielite nel nostro paese è stato compreso il WNV. Classificato nel genere *Flavivirus*, famiglia *Flaviviridae*, è costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva lineare di circa 11.029 nucleotidi. Il WNV è compreso nel sierogruppo del virus dell'Encefalite Giapponese assieme a Japanese encephalitis virus, Murray Valley encephalitis virus, al ceppo Alfuy, St. Louis encephalitis virus ed il Kunjin virus, nonché altri virus fra cui ricordiamo, perché di interesse ai fini della diagnosi differenziale, Usutu virus. Il genoma è organizzato in una breve regione non codificante di 96 nucleotidi all'estremità 5' (5'UTR) seguita da una singola open reading frame (ORF) di 10.301 nucleotidi e da una regione non codificante di 631 nucleotidi all'estremità 3' (3' UTR). La singola ORF codifica per le seguenti proteine: proteina C del nucleocapside, proteina M di membrana, proteina E dell'envelope e le proteine non strutturali NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Fig. 1)(9).

Fig. 1



Sino al 2005 i ceppi di virus WN erano classificati in due lineages: il lineage 1, comprendente gli isolati responsabili di epidemie umane, e il lineage 2 cui appartengono, virus endemici in Africa subsahariana e Madagascar (10). Recentemente (1), a seguito di identificazione di due ceppi con caratteristiche genetiche diverse (RabV 97-103 e RabV 99-222) è stata proposta una classificazione di WNV comprendente due ulteriori linee genetiche, rispettivamente 3 e 4.

In letteratura sono descritti metodi che amplificano la NC e la NS5 (5). Nel presente lavoro viene descritta la messa a punto di un test di real time RT-PCR per la rilevazione di una porzione del genoma compresa fra i geni NS1 ed NS2a.

Materiali e metodi

-Matrici impiegate per la messa a punto del metodo - Sono stati impiegati due tipi di materiali: 1) come negativo, SNC di equino regolarmente macellato e risultato negativo al test real time RT-PCR nei confronti della NC; 2) come campione positivo è stato omogeneizzato lo stesso tessuto con il ceppo di riferimento Egypt 101 inattivato.

-Metodiche di estrazione dell'RNA totale - È stata impiegata una metodica di estrazione che prevede una fase di omogenizzazione e di separazione dell'acido nucleico di interesse effettuata secondo le istruzioni riportate dal Fast RNA® Pro Green Kit (Q-BIO gene) e seguita dalla purificazione dell'RNA mediante colonnine silica-based (Qiagen).

-Scelta dei primers e delle sonde TaqMan - Per la ricerca di regioni conservate nel genoma di WNV è stato effettuato il multiallineamento tra i genomi dei ceppi isolati negli animali: WNV NY99 (GenBank accession no. AF202541), WNV NY99EQ (GenBank accession no. AF2609667), WNV Italy 98 (GenBank accession no. AF404757), Romania 1996 (GenBank accession no. AF260969), Egypt 101 (GenBank accession no. AF260968) e Kunjin (GenBank accession no. D00246). Il multiallineamento è stato ottenuto mediante il metodo CLUSTAL W ed utilizzando il programma Lasergene (DNA Star Inc., versione 5, Madison WI, USA). È stata selezionata una regione bersaglio altamente conservata tra i ceppi WNV sopra riportati che si estende per 46 nucleotidi nella porzione codificante per NS1 (proteasi coinvolta nella replicazione virale) e per 133 nucleotidi nella porzione codificante per NS2a (proteasi coinvolta nell'assemblaggio virale). La sequenza consensus elaborata (da noi chiamata NS2a) è stata così analizzata mediante il programma Primer Express version 3,0 (Applied Biosystems) ed è stata evidenziata una regione bersaglio che si estende dal 3516° nucleotide al 3621° nucleotide. Le sequenze dei primers e della sonda sono state confrontate con quelle depositate in GenBank mediante BLAST. Le sequenze dei primers e della sonda sono le seguenti:

WNV Fw : 5'-AGTGAATGCTTACAATGCTGATATGAA-3'

WNV Rv : 5'-GATCTTGGCTGTCCACCTCTTG-3'

WNV probe : 5'-FAM-CCTTCTGGTCGTGTTCTTGCCACC-TAMRA-3'

-Ottimizzazione della real time RT-PCR - L'ottimizzazione del test è stata effettuata impiegando una serie di combinazioni delle concentrazioni dei primers. Ogni combinazione di primers è stata analizzata in duplicato, utilizzando come stampo sia l'RNA totale estratto dalle cellule BHK21 infette con ceppo Egypt 101, sia diluizioni in base 10 dell'RNA relativo al gene NS2a trascritto in vitro. L'amplificazione è stata eseguita con lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) e con le seguenti condizioni: 12,5µl di 2X master mix, 0,65µl di 40X enzyme multiscrivi, 0,2µM di sonda, 0,6µM di entrambi i primers e 5µl di stampo in 25µl finali. I cicli consistono in: 30' a 48°C, 10' a 95°C, seguita da 50 cicli composti da 95°C X 15" e 60°C X 1'.

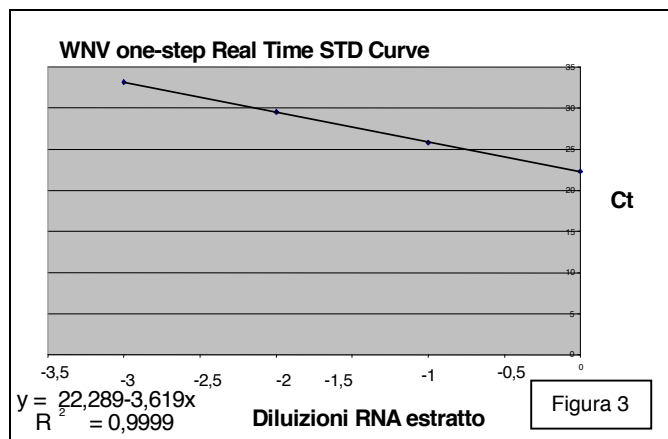
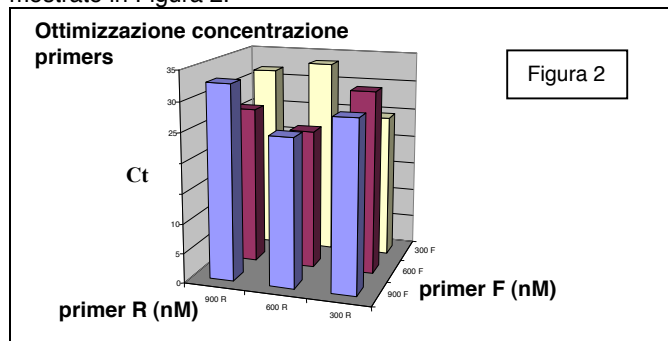
-Sensibilità e specificità relativa, limite di rilevabilità - Per stabilire il limite di rilevazione del saggio real time RT-PCR è stato sintetizzato *in vitro* l'RNA bersaglio relativo al gene NS2a (RNA-NS2a) con lo scopo di essere impiegato sia per la messa a punto del sistema, sia come controllo positivo della reazione. A tal fine la regione target è stata amplificata (105 bp) e clonata all'interno del plasmide pCRII-TOPO (TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter, Invitrogen). Il clonaggio è stato confermato mediante sequenziamento effettuato con il BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e con l'apparecchiatura ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La reazione di trascrizione *in vitro* è stata effettuata con il kit Mega script T7/Sp6 (Ambion) seguita dalla purificazione del trascritto con colonnine Centri-Sep (Princeton Separation, INC).

Per la valutazione della sensibilità relativa sono stati utilizzati primers e sonda, relativi alla regione NC, che si estendono dal 10.668° nucleotide al 10.770° nucleotide (7).

La specificità di questo saggio è stata testata su genoma estratto da ceppi: a) di WNV Lineage 1 stipiti NY99-snowy owl (ATCC), NY99 equine, NY99 crow, Arb 310/67, Egypt 101, Italy 98, rispettivamente di origine americana, centro africana, nord africana ed europea; b) WNV Lineage 2, stipite B956(ATCC) di origine ugandese; c) Usutu virus, stipite SAR 1776 di origine sud africana; d) BDV ed EHV1, entrambi responsabili di encefalomieliti negli equini. Per la sensibilità relativa e l'elaborazione della curva standard sono state effettuate diluizioni seriali in base 10 dell'RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette.

Risultati e Discussione

Per stabilire la concentrazione ottimale di entrambi i primers è stato utilizzato sia l'RNA sintetizzato *in vitro* contenente la regione bersaglio che l'RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette e tale concentrazione è risultata essere di 0,6µM come mostrato in Figura 2.



Nella Fig.3 è riportato il grafico relativo alla curva standard ottenuta impiegando i valori medi dei Ct delle cinque repliche di ciascuna diluizione dei campioni di RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette. Si osserva una relazione lineare

tra le diluizioni di stampo ed i valori di Ct con un quadrato del coefficiente di correlazione intorno a 0,99, indice di un ottimo funzionamento dei primers selezionati. L'efficienza del test è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ dove lo slope è pari a -3,619 ed è risultata essere del 90%. L'efficienza del test è stata confermata utilizzando l'RNA sintetizzato *in vitro* e relativo al gene NS2a; inoltre è stato appurato che la linearità del saggio di real time RT-PCR è compresa tra 10^6 molecole (con Ct=20) e circa 120 molecole (con Ct = 33) di RNA-NS2a.

Nella tabella 1 sono riportati i risultati della comparazione effettuata impiegando il nostro saggio e quello avente come bersaglio il gene NC. I risultati sono paragonabili per tutti e due i target molecolari.

Tabella 1. Media dei Ct relativi alle due repliche per ciascuna diluizione dell' RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette.

Stampo	primers NS2a	primers NC
Dil.10 ⁻¹	22,33	22,71
Dil.10 ⁻²	25,33	26,34
Dil.10 ⁻³	28,98	29,75

La sensibilità del nostro metodo nei confronti dei primers NC è riportata in tabella 2 impiegando come stampo l'RNA totale estratto dai diversi virus esaminati. I primers NS2a hanno mostrato una maggiore sensibilità rispetto ai primers NC, avendo rilevato anche il ceppo di origine ugandese B956 appartenente al lineage 2. Questo risultato riveste particolare interesse considerato che, a fronte dei differenti flussi migratori delle specie aviarie, il continente europeo è a maggior rischio di introduzione del lineage 2 rispetto a quello americano.

Tabella 2. Media dei Ct relativi alle due repliche per ciascuna dell'RNA totale estratto dai virus considerati.

Virus	primers NS2a	primer NC
WNV B956 (ATCC)	28,66	negativo
WNV NY99-snowy owl (ATCC)	20,16	16,29
WNV Arb 310/67	16,68	23,13
Usutu virus SAR 1776	negativo	negativo
WNV NY99 equine	19,66	15,91
WNV NY99 crow	19,48	16,20
WNV Italy 98	16,72	16,37
Egypt 101	22,29	22,58

I primers selezionati sono risultati specifici per WNV non avendo amplificato né un virus correlato (Usutu virus), né regioni del genoma di altri virus encefalitogeni degli equini oggetto della nostra ricerca (BDV, EHV-1). Pertanto, il saggio può essere utilmente impiegato nella diagnosi molecolare contemporanea delle differenti neuropatologie di origine virale della specie equina.

Considerate le caratteristiche zoonosiche della WN ed il rischio di infezioni in laboratorio, l'RNA bersaglio relativo al gene NS2a (RNA-NS2a) sintetizzato *in vitro* con lo scopo di definire l'efficienza del metodo, costituisce un controllo positivo della reazione a rischio biologico nullo, utile per l'impiego nella diagnostica corrente.

Riferimenti bibliografici

1. Bakonyi T. et al. (2005) Emerg. Infect. Dis. 11 (2): 225-231.
2. Komar N. et al. (2003). Adv. Virus Res. 61;185-234
3. Koh W-L. et al. (2005) Emerg. Infect. Dis. 11; 629-632
3. Hayes et al. (2005) Emerg. Infect. Dis. 11; 1167-1173.
4. Lanciotti R. S. et al. (2002). Virology, 298; 96-105.
5. Day-Yu Chao et al. (2007). Jour. of Clin. Micr. 584-589.
6. Lanciotti R.S. et al. (2000) Jour. of Clin. Micr. 4066-4071.
7. Lanciotti R. S. et al. (2002) Virology, 299: 96-105.
9. Poidinger M. et al. (1996) Virology 218: 417-421.
10. Tsai T.F. et al.(1998) Lancet. 352: 767-771.

Lavoro svolto nell'ambito della Ricerca Finalizzata 2005, art.12 D. Lvo 502/92, "Sviluppo di metodi diagnostici per la sorveglianza delle neuropatologie di origine virale degli equini."