

VALIDAZIONE DI METODI *REAL-TIME* PCR PER LA DIAGNOSI SIMULTANEA DI ALCUNE ENCEFALOMIELITI VIRALI DEGLI EQUIDI

Marcello Sala (a), Antonella Cersini (a), Armando Damiani (b), Maria Teresa Scicluna (a), Giuseppe Manna (a), Valentina Spallucci (a), Andrea Caprioli (a), Maria Ilaria Ciabatti (a), Gian Luca Autorino (a)

(a) *Centro di Referenza per le Malattie degli Equini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma*

(b) *Department of Veterinary Microbiology and Immunology, Cornell University, Ithaca, NY, USA*

Introduzione. Nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata 2005 (art. 12 DLvo 502/92) sono stati messi a punto tre saggi metodi di *Real-Time* PCR, per la diagnosi virologica di encefalomieliti virali a rischio di diffusione negli equidi in Italia, selezionando nuovi *target* molecolari altamente conservati del Herpesvirus Equino tipo 1 (EHV-1, gene gE), del *Virus West Nile* (WNV, gene NS1 e NS2a) e del Bornavirus (BDV, gene M). Obiettivo del presente lavoro è stato la validazione di tali metodi per la ricerca simultanea e la diagnosi differenziale da impiegare nei laboratori nazionali nell'ambito delle attività di sorveglianza.

Metodi. È stato condotto un circuito di prova con 17 laboratori nazionali ed europei: sono state distribuite tre serie di 20 campioni di tessuto nervoso di cavallo, codificati in maniera univoca, che sono stati analizzati in cieco, in tre sedute indipendenti, mediante *Real-Time* PCR. Il *panel* era costituito da 10 campioni di riferimento negativi, 3 positivi per WNV, 4 positivi per EHV-1 e 3 positivi per BDV. Per ogni laboratorio è stata valutata l'accuratezza dei risultati. Sono state inoltre valutate la ripetibilità (*intra-laboratorio*) e la riproducibilità (*inter-laboratorio*) dei risultati forniti per singola diagnosi, (separatamente per WNV, EHV1, BDV) e complessiva per i tre virus, mediante calcolo della statistica Kappa. Sono stati considerati soddisfacenti valori di accuratezza pari al 100% e valori di Kappa >0,8, secondo il criterio di valutazione di Landis e Kock.

Risultati. 15 laboratori su 17 hanno mostrato accuratezza e ripetibilità pari al 100%, con un grado di accordo completo (Kappa=1) rispetto al valore di riferimento per singola diagnosi e per positività complessiva ad uno nei confronti dei 3 virus. 2 laboratori hanno invece mostrato problemi di minore accuratezza (<100%) per una o più diagnosi e valori di Kappa di ripetibilità <0,8 a causa di risultati falsamente positivi o falsamente negatividiscordanti. Nel complesso, i 17 laboratori inclusi nell'analisi di riproducibilità hanno fornito un elevato livello di accordo rispetto all'atteso (Kappa multiplo >0,96), sia per le singole diagnosi considerate separatamente sia per la positività complessiva ad uno dei 3 virus.

Conclusioni. I risultati ottenuti hanno evidenziato elevate sensibilità e specificità diagnostiche dei metodi *Real-Time* PCR impiegatimessi a punto per la ricerca simultanea del genoma dei genomi di WNV, EHV-1 e BDV. I risultati in termini di accuratezza, ripetibilità e riproducibilità ne hanno consentito la validazione secondo i criteri definiti dall'OIE. La precisione di tali metodi costituisce una caratteristica prefigurandone pertanto un possibile impiego fondamentale ai fini del loro impiego nell'ambito dell'attività di sorveglianza.