

RICERCA FINALIZZATA 2005

REPORT DEFINITIVO

Progetto IZSLT PRF2005301 - Sviluppo di metodi diagnostici per la sorveglianza delle neuropatologie di origine virale degli equini

Area tematica: Sanità Animale

A 8.1.4. Messa a punto di tecniche diagnostiche di laboratorio, ad alto valore predittivo, con particolare riguardo a quelle applicabili per la diagnosi di routine in larga scala;

Responsabile Scientifico: *Gian Luca Autorino*

Struttura di appartenenza: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411 – 00178 Roma
e-mail gianluca.autorino@izslt.it

Funzione: *Responsabile Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini*
Durata del progetto: *mesi 24*

INDICE GENERALE

ELENCO DEI COLLABORATORI	4
SINTESI IN ITALIANO	9
<i>Contributi scientifici prodotti nel corso della ricerca</i>	15
ELABORATO TECNICO	
<i>Realizzazione di PCR Real Time simultanee e di tecnologia microarray per EHV 1, EHV 4, WNDV E BDV</i>	
<i>Studio dei diversi genomi di BDV per l'identificazione delle regioni da amplificare</i>	18
<i>Selezione dei primers idonei per BDV per l'impiego in Real Time RT-PCR</i>	21
<i>Messa a punto di un protocollo di Real Time RT-PCR per la diagnosi di BDV</i>	24
<i>Studio dei genomi virali di EHV 1 ed EHV4 per la scelta delle regioni target da sottoporre ad amplificazione</i>	29
<i>Messa a punto del protocollo di Real Time PCR per EHV 1 ed EHV4</i>	31
<i>Studio dei diversi genomi virali per l'identificazione delle regioni target del WNV da sottoporre ad amplificazione</i>	40
<i>Messa a punto di un protocollo di Real Time RT-PCR per la diagnosi di WNV</i>	47
<i>Valutazione di diversi metodi di estrazione di DNA/RNA da diverse matrici biologiche</i>	60
<i>Bibliografia consultata per la realizzazione di PCR Real Time simultanee per EHV 1, EHV 4, WNDV e BDV</i>	66
<i>Realizzazione del set diagnostico per EHV 1, EHV 4, WNDV e BDV mediante tecnologia microarray</i>	71
<i>Individuazione delle sonde</i>	72
<i>Disegno delle sonde</i>	89

<i>Messa a punto dello spottaggio del vetrino per tecnologia microarray</i>	101
<i>Valutazione dei diversi metodi per la preparazione del campione</i>	104
<i>Valutazione di diverse condizioni di ibridazione del microarray</i>	108
<i>Bibliografia consultata per la realizzazione del set diagnostico mediante tecnologia microarray</i>	130
<i>Procedura operativa standard microarray</i>	134
<i>Circuito interlaboratorio su metodi qualitativi di Real Time PCR</i>	147
<i>Sviluppo di metodi diagnostici immunologici</i>	182
<i>ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti WNV</i>	186
<i>Procedura operativa standard per l'esecuzione dell'elisa per WNV</i>	188
<i>Circuito interlaboratorio per la Validazione Preliminare dell'ELISA per la Ricerca di Anticorpi Verso il Virus della West Nile</i>	194
<i>Attività svolta per malattia di borna</i>	208
<i>Allegato 1</i> <i>BROCHURE CORSI FORMAZIONE</i>	
<i>Allegato 2, 2 bis</i> <i>PRESENTAZIONI CORSI FORMAZIONE</i>	
<i>Allegato 3</i> <i>REPORT DI VALIDAZIONE CIRCUITO INTERLABORATORIO PER REAL TIME PCR</i>	
<i>Allegato 4</i> <i>REPORT DI VALIDAZIONE CIRCUITO INTERLABORATORIO ELISA WND</i>	
<i>Allegato 5</i> <i>RISULTATI INDAGINE BORNAVIRUS</i>	

ELENCO DEI COLLABORATORI E CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

U.O. n. 1 Demetrio Amaddeo, Biologo. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

Sviluppo di metodi diagnostici diretti ed indiretti: produzione e acquisizione di diversi virus di riferimento. Studio dei diversi genomi virali per la scelta delle regioni target da sottoporre ad amplificazione. Selezione dei primers idonei per l'impiego in PCR real time. Definizione e verifica di condizioni operative comuni per l'esecuzione simultanea delle 4 PCR real time. Valutazione di diversi metodi di estrazione di DNA/RNA da diverse matrici biologiche. Valutazione della sensibilità assoluta e relativa delle PCR real time per i diversi agenti eziologici e, ove possibile, rispetto a metodi di confronto. Valutazione della specificità delle diverse PCR real time nei confronti di rispettivi ceppi di diversa origine. Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati. Definizione della metodologia per la esecuzione delle prove interlaboratorio. Allestimento di serie di campioni biologici per l'esecuzione delle prove interlaboratorio con i metodi di diagnostica molecolare. Elaborazione statistica dei dati delle prove interlaboratorio.

Verifica dei metodi messi a punto: controllo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti con i metodi messi a punto. Caratterizzazione di eventuali stipiti rilevati nel corso delle attività di cui al punto precedente.

U.O. n.2 - Paolo Cordioli, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Emilia Romagna e della Lombardia

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

Sviluppo di metodi diagnostici diretti ed indiretti: produzione e acquisizione di sieri positivi e negativi per i diversi virus e di stipiti virali di campo e di riferimento. Produzione dei diversi stipiti virali in colture cellulari e purificazione degli stessi. Produzione di anticorpi monoclonali, caratterizzazione e selezione degli stessi in funzione della specifica avidità ed affinità rispetto agli epitopi degli antigeni ed in relazione ai possibili diversi impieghi nei metodi immunologici. Preparazione degli anticorpi marcati. Definizione dei metodi immunologici da impiegare per la diagnosi indiretta delle diverse infezioni. Definizione e verifica delle condizioni operative per i diversi metodi immunoenzimatici ed immunoistochimici sviluppati e/o messi a punto. Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati. Valutazione preliminare delle caratteristiche di precisione ed accuratezza dei diversi metodi immunoenzimatici.

Organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio: Trasferimento di protocolli diagnostici, di materiali di riferimento e campioni alle U.O. partecipanti al circuito. Esecuzione delle prove e trasferimento dei risultati.

Verifica dei metodi messi a punto: prelievo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti. Controllo degli stessi con i metodi messi a punto.

Caratterizzazione di eventuali stipiti rilevati nel corso delle attività di cui al punto precedente.

U.O. n. 3 – Elena Bozzetta, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale Piemonte Lombardia e Valle d'Aosta

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

Sviluppo di metodi diagnostici diretti ed indiretti *Produzione e acquisizione di sieri positivi e negativi per i diversi virus e di stipiti virali di campo e di riferimento. Definizione dei metodi immunologici da impiegare per la diagnosi indiretta delle diverse infezioni. Definizione e verifica delle condizioni operative per i diversi metodi immunoenzimatici ed immunoistochimici sviluppati e/o messi a punto. Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi immunoenzimatici sviluppati. Valutazione preliminare delle caratteristiche di precisione ed accuratezza dei diversi metodi per la diagnosi indiretta.*

Organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio: *definizione della metodologia per la esecuzione delle prove interlaboratorio. Trasferimento di protocolli diagnostici, di materiali di riferimento e campioni alle U.O. partecipanti al circuito. Esecuzione delle prove e trasferimento dei risultati.*

Verifica dei metodi messi a punto *Prelievo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti. Controllo degli stessi con i metodi messi a punto. Comparazione dei risultati ottenuti con i metodi descritti con lo studio descrittivo delle lesioni neuropatologiche eventualmente accertate*

U.O. n. 4 – Calogero Terregino, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

U.O. n. 5 – Domenico Rutili, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche

U.O. n. 6 – Gíantonella Puggioni, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

U.O. n. 7 – Donatella Nava, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno

U.O. n. 8 – Nicola Cavaliere, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale Puglia e Basilicata

U.O. n. 9 – Fabrizio Vitale, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

Sviluppo di metodi diagnostici diretti ed indiretti

- *Esecuzione delle prove interlaboratorio e trasferimento dei risultati.*

Verifica dei metodi messi a punto

- *prelievo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti.*
- *Controllo degli stessi con i metodi messi a punto*

METODOLOGIA

P 4: Organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio

- *Esecuzione delle prove interlaboratorio*

U.O. 13 – Carlo Cantile, Università degli Studi di Pisa – Facoltà Medicina Veterinaria

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

Definizione e verifica delle condizioni operative per i diversi metodi immunoenzimatici ed immunoistochimici sviluppati e/o messi a punto.

Verifica dei metodi messi a punto Prelievo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti. Controllo degli stessi con i metodi messi a punto. Comparazione dei risultati ottenuti con i metodi descritti con lo studio descrittivo delle lesioni neuropatologiche eventualmente accertate

U.O. n. 10 – Wilma Ponti, Medico Veterinario, Università degli Studi di Milano – Facoltà Medicina Veterinaria

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

L'unità operativa si propone di realizzare un metodo veloce, sensibile e diretto per l'identificazione di infezioni virali multiple con il valore aggiunto della possibile genotipizzazione dei virus identificati. A tal fine verrà messo a punto un dispositivo diagnostico molecolare per l'identificazione e la tipizzazione di patogeni virali (EHV1, EHV4, WNDV, BDV) in campioni biologici ottenuti da cavalli in un'unica sessione di analisi mediante tecnologia microarray. La peculiarità del sistema proposto risiede nella capacità di analisi simultanea di molteplici specie virali e di eventuali mutanti delle stesse non ancora utilizzabili dalle metodiche diagnostiche "standard". A ciò si aggiunge una notevole riduzione dei tempi di risposta del test proposto rispetto a quelli attualmente in uso. Infatti l'utilizzo di un sistema molecolare ad alta sensibilità come il microarray elimina la necessità di colture cellulari dei campioni: tale passaggio è invece normalmente obbligatorio nel caso dei test standard per garantirne la sensibilità. Oltre all'identificazione dei virus quindi è inoltre possibile caratterizzare e tipizzare simultaneamente gli stipiti rilevati, consentendo di avere in tempi rapidissimi uno strumento diagnostico fondamentale anche per uno studio epidemiologico

U.O. 12 – Maria Teresa Scicluna, Medico Veterinario. Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana

CONTRIBUTO FORNITO AL PROGRAMMA

Sviluppo di metodi diagnostici diretti ed indiretti: produzione e acquisizione di sieri positivi e negativi per i diversi virus e di stipiti virali di campo e di riferimento. Definizione dei metodi immunologici da impiegare per la diagnosi indiretta delle diverse infezioni. Definizione e verifica delle condizioni operative per i diversi metodi immunoenzimatici ed immunoistochimici sviluppati e/o messi a punto. Valutazione preliminare delle caratteristiche di precisione ed accuratezza dei diversi metodi .

Organizzazione ed esecuzione di prove interlaboratorio: definizione della metodologia per la esecuzione delle prove interlaboratorio. Allestimento di serie di campioni biologici per l'esecuzione delle prove interlaboratorio con i metodi di diagnostica molecolare ed i metodi sierologici.

Trasferimento di materiali di riferimento e campioni alle U.O. partecipanti al circuito. Esecuzione delle prove e trasferimento dei risultati. Elaborazione statistica dei dati per la valutazione della ripetibilità, riproducibilità e concordanza delle prove interlaboratorio.

Verifica dei metodi messi a punto: *prelievo di campioni in corso di sindromi neurologiche e da animali deceduti. Controllo degli stessi con i metodi messi a punto*

SVILUPPO DI METODI DIAGNOSTICI PER LA SORVEGLIANZA DELLE NEUROPATOLOGIE DI ORIGINE VIRALE DEGLI EQUINI

INTRODUZIONE

Le malattie virali responsabili di sindromi encefaliche degli equidi sono causate da diverse famiglie virali che hanno una diffusione cosmopolita e possono determinare notevoli ripercussioni sullo stato di salute delle popolazioni animali nonché un significativo impatto economico sulle produzioni e gli scambi degli animali appartenenti a tali specie.

Accanto alle infezioni più diffuse e conosciute causate dall'EHV 1, e solo di recente dall'EHV 4, responsabili di sindromi encefaliche sporadiche associate alla rinopolmonite equina, viene attribuita importanza anche ad altri agenti virali. Alcuni di questi virus assumono rilevanza di sanità pubblica, o in virtù del loro potenziale zoonosico, o perché in grado di infettare sia gli equini che l'uomo, senza trasmissione reciproca tra i due ospiti. A causa dei recenti focolai epidemici nelle popolazioni equine rilevati in Italia, Francia, Stati Uniti e Nord Africa e delle evidenze di circolazione virali in popolazione umana dell'Est Europa, Stati Uniti, Israele e recentemente in Portogallo, ha assunto importanza anche nel nostro paese l'encefalomielite causata dal virus West Nile (WN).

Crescente attenzione viene posta anche nei confronti di una meningoencefalite nota da tempo negli equini e negli ovini come Malattia di Borna, ma solo recentemente caratterizzata eziologicamente con l'isolamento e la tipizzazione di un RNA-virus (BDV) a singolo filamento, classificato nell'ordine Mononegavirales, famiglia dei Bornaviridae. Tale virus, frequentemente isolato in Europa centrale, ha un'ampia distribuzione geografica ed un ampio spettro d'ospite che include anche l'uomo, nel quale si sospetta un'associazione con forme di disturbi mentali e comportamentali. In Germania, il virus è stato considerato come la prima causa di malattie del sistema nervoso centrale negli equidi. La presenza di BDV è stata segnalata anche in Austria, Svizzera e Francia. Nel nostro Paese la malattia è stata segnalata da Caramelli et al. nel 1996, in ovini piemontesi con sintomatologia neurologica progressiva. Le indagini sono state intraprese nell'ambito della sorveglianza sulle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili nel 1998, nella cui diagnosi differenziale il BDV deve essere considerato a causa del quadro clinico. Da una ricerca condotta nel triennio 2000-2003 è emersa la presenza sia di positività sierologiche, sia alla RT-PCR eseguita su SNC di bovini e ovini con meningo-encefalite non purulenta. Tuttavia la modesta concentrazione di virus nei tessuti e le difficoltà di isolamento rendono necessario l'impiego di strumenti diagnostici di elevata sensibilità e specificità. Ad oggi non sono disponibili dati circa la sua diffusione nella popolazione equina in Italia.

Rispetto alle infezioni sostenute dai virus citati la diagnosi clinica differenziale spesso non è possibile a causa di sintomatologie comuni, pertanto risultano indispensabili gli accertamenti di laboratorio.

Ad eccezione dei due virus erpetici citati, per i quali è noto il tropismo limitatamente alla specie equina, per quanto riguarda la manipolazione di materiale biologico e dei

virus WN e BD sono possibili i rischi d'infezione per gli addetti alle attività di laboratorio.

Per quanto riguarda la diagnosi diretta sono già disponibili metodi molecolari per la ricerca dei virus menzionati che tuttavia non consentono una rapida diagnosi differenziale fra le varie infezioni. Non esistono inoltre metodi immunoenzimatici per la ricerca diretta dei virus.

SINTESI IN ITALIANO

OBIETTIVI

Il progetto di ricerca aveva come obiettivo lo sviluppo di nuove metodiche diagnostiche ed il miglioramento di metodi analitici in uso per la diagnosi di alcune delle encefalomieliti virali presenti nel continente europeo, non ancora oggetto di diagnosi specifica nel nostro paese attraverso:

- *la standardizzazione e la validazione di metodi a basso rischio biologico in ambito nazionale.*
- *La messa a punto di metodiche per la rapida diagnosi differenziale, mettendo a punto:*
 1. *diverse PCR Real Time che consentano l'esecuzione simultanea di ricerche nei confronti di più agenti eziologici, responsabili di sindromi neurologiche nell'uomo e negli equini*
 2. *lo studio di un altro sistema diagnostico simultaneo basato sull'impiego di microarray per l'identificazione e la tipizzazione di questi patogeni virali in un'unica sessione di analisi*
 3. *il miglioramento della sensibilità e la specificità dei test sierologici mediante la produzione di anticorpi monoclonali.*
- *Il confronto dei risultati ottenuti con i metodi descritti con lo studio descrittivo delle lesioni neuropatologiche eventualmente accertate.*
- *L'impiego degli strumenti diagnostici realizzati nella rete di sorveglianza nazionale per le patologie degli equini anche allo scopo di fornire indicazioni relative alla circolazione di agenti patogeni anche per la popolazione umana*

METODOLOGIA

Ai fini dell'avviamento della ricerca, sono stati realizzati due eventi formativi sulle neuropatologie di origine virale dei cavalli rispettivamente organizzati a Milano ed a Roma, rivolti ai veterinari liberi professionisti ed ai veterinari pubblici operanti nel settore con lo scopo di effettuare uno specifico aggiornamento, presentare le attività del progetto e la scheda epidemiologica e di invio campioni ai fini della realizzazione di un sistema di sorveglianza integrato.

Per la realizzazione di metodi molecolari in PCR Real Time e con tecnologia microarray per la ricerca del genoma di EHV 1, EHV 4, WNDV E BDV sono stati:

- *Sviluppati di metodi PCR Real Time*
- *Messi a punto i metodi di estrazione di DNA/RNA da diverse matrici biologiche*
- *Messi a punto di metodi di preparazione campione per tecnologia microarray e standardizzate le condizioni di spottaggio e ibridazione del microarray*
- *Sviluppata e standardizzata una PCR simultanea per i 4 virus, valutandone la sensibilità e ripetibilità dei risultati*
- *Elaborate procedure operative standard relative ai metodi di PCR sviluppati*

Ai fini delle prove immunologiche sono stati:

- *Prodotti i diversi reagenti attraverso le fasi di produzione dei diversi stipiti virali in colture cellulari con purificazione degli stessi, di immunizzazione di topi Balb/c per la produzione di anticorpi monoclonali e la caratterizzazione degli stessi in termini di specificità ed avidità.*
- *Prodotti e reperiti sieri positivi e negativi per i diversi virus*
- *Definiti i metodi immunologici da impiegare*
- *Preparati gli anticorpi coniugati da impiegare in prove immunoenzimatiche*
- *Definite le condizioni operative ed i valori di cut-off impiegando sieri sicuramente positivi e negativi*
- *Effettuati i controlli di precisione, ripetibilità, riproducibilità ed accuratezza dei metodi ed elaborate le procedure operative standard relative ai metodi sviluppati*

Per l'organizzazione e l'esecuzione delle prove interlaboratorio si è proceduto alla:

- *Definizione della metodologia*
- *Allestimento di serie di campioni biologici per l'esecuzione delle prove interlaboratorio con i metodi di diagnostica molecolare ed i metodi sierologici*
- *Trasferimento dei protocolli diagnostici e dei materiali di riferimento alle U.O. partecipanti al circuito*
- *Esecuzione delle prove*
- *Elaborazione statistica dei dati per la valutazione della ripetibilità, riproducibilità e concordanza*

I metodi messi a punto e sottoposti alla validazione preliminare sono stati quindi distribuiti alla rete degli IZZSS ai fini della loro valutazione nell'ambito delle attività di sorveglianza ed al fine dell'impiego su campioni di campo.

RISULTATI E CONCLUSIONI

1) I saggi di Real Time PCR sviluppati risultano specifici ed avere caratteristiche di sensibilità analitica e diagnostica superiore ai metodi tradizionali e ad altri metodi molecolari disponibili al periodo di inizio del progetto.

In particolare:

- *il saggio per WNV, avente come target il gene NS2a, risulta più sensibile del test di riferimento avente come bersaglio il gene NC. I primers NS2a hanno*

mostrato anche una maggiore sensibilità diagnostica rispetto ai primers NC, essendo in grado di rilevare anche il ceppo di origine ugandese B956 appartenente al lineage 2. Questo risultato riveste particolare importanza in quanto, a partire dal 2007, il continente europeo è interessato dalla contemporanea circolazione dei lineage 1 e 2. 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.

- La nostra real-time RT-PCR per Bornavirus, avente come target il gene M, confrontata con altri due saggi che impiegano come bersaglio il gene p40 e p24 di BDV ha fornito risultati paragonabili. I primers selezionati non hanno peraltro amplificato regioni del genoma del WNV ed EHV-1. Il metodo è stato cimentato su cervelli di ovini sardi inviati a seguito del riscontro di sintomi neurologici e lesioni istopatologiche compatibili per infezione da BDV, fornendo esito positivo. Per eliminare dubbi relativi ad eventuali cross/over contaminazioni, sono state ripetute sia le estrazioni, sia le amplificazioni con risultati analoghi. Considerato che la segnalazione di casi d'infezione accompagnati da forme di malattia neurologica in animali autoctoni assumerebbe particolare rilevanza ed interesse epidemiologico, si procederà ad approfondire ulteriormente i risultati ottenuti valutando la specificità delle sequenze degli amplificati ed esaminando gli stessi campioni anche mediante l'impiego di una metodica di RT-nested PCR alternativa.
- Anche la Real Time PCR per EHV-1 ed EHV-4 dimostra essere notevolmente sensibile sia in termini assoluti, in quanto in grado di rilevare anche limitati numeri di copie di DNA virale dalle diluizioni limite dei campioni, sia relativi, essendo in grado di rilevare ceppi virali di diversa origine. Il saggio risulta inoltre avere caratteristiche di elevata ripetibilità. L'impiego su campioni clinici (26 campioni di tessuti fetali, 28 tamponi nasali e da 14 ceppi isolati in tissutocoltura) ha mostrato il 100% di concordanza tra i risultati della Real Time PCR e le Seminested PCR specifiche per EHV-1 ed EHV-4.

2) Sono stati valutati differenti **protocolli di estrazione dell'acido nucleico da tessuto nervoso** selezionando quello risultato altamente efficiente e di ottima qualità come da verifica spettrofotometrica. Inoltre, i campioni di tessuto nervoso contaminati artificialmente non hanno mostrato presenza di sostanze inibenti quando sottoposti ad amplificazione.

3) Validazione dei metodi di Real Time PCR: il circuito interlaboratorio fra la rete dei 17 laboratori partecipanti, ha mostrato la capacità di fornire risultati con accuratezza > 98% e riproducibilità > 0,97. Tale risultato viene considerato SODDISFACENTE ad indicare le elevate performance delle metodiche RT-PCR utilizzate per la diagnosi singola e simultanea (in parallelo) di WNDV-BDV-EHV-1. In particolare si rilevano sensibilità, specificità e riproducibilità tali da prefigurare un efficace utilizzo di tali metodiche per la diagnosi differenziale e simultanea dei 3 virus nella routine diagnostica della rete dei Laboratori IZZSS.

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 nei confronti dei 3 virus. 2 laboratori hanno invece mostrato minore accuratezza (< 100%) per una o più diagnosi e valori di Kappa < 0,8 a causa di risultati discordanti forniti nelle 3 sedute indipendenti di prova sugli stessi campioni di riferimento.

Nel complesso alla valutazione della Riproducibilità i 17 laboratori inclusi nell'analisi 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 ai 3 virus.

I risultati ottenuti hanno evidenziato elevate sensibilità e specificità diagnostiche dei metodi Real-Time PCR messi a punto per la ricerca simultanea 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 fondamentale ai fini del loro impiego nell'ambito dell'attività di sorveglianza.**

4) Saggi mediante l'impiego di tecnologia microarray: I pochi campioni di analizzati di WNV, pur essendo stati tutti confermati e identificati anche a livello di ceppo non consentono un'elaborazione statistica dei risultati. I risultati indicano in ogni caso una sensibilità del test del 100% per i campioni di WNV e per la caratterizzazione dei "ceppi". I risultati sui campioni in cieco sembrano indicare che tale metodica potrebbe essere robusta anche in condizioni di campo nell'identificare i virus responsabili delle forme neurologiche dei cavali testati. Tuttavia, a parte per i ceppi di WNV, tale metodica pone alcune perplessità relativamente all'efficacia nell'identificazione del ceppo circolante, sia per problemi legati alle sonde stesse (soprattutto nel caso di BDV, dove le differenze nucleotidiche sono talmente ridotte da rendere difficile una distinzione sicura tra ceppi), sia per quanto riguarda la necessità di effettuare delle PCR nested per aumentare la sensibilità della metodica, come nel caso della neurovirulenza di EHV che comporta una perdita delle sonde da utilizzare.

Relativamente alla soluzione di questi due aspetti, per quelle sonde dove la distinzione tra due ceppi si basa su uno o due nucleotidi, sarà possibile inserire in futuro nell'array, insieme alla sonda specifica per il ceppo, anche le altre sonde con il nucleotide diverso, al fine di comparare i risultati di intensità di fluorescenza e valutare la positività per la sonda più specifica. Inoltre, per valutare la neurovirulenza dei ceppi EHV1, sarebbe necessario prevedere una terza metodica di PCR specifica per EHV1, aumentando tuttavia la complessità del sistema diagnostico. In conclusione, la metodica di

microarray appare attendibile per identificare i virus responsabili di forme neurologiche.

Tuttavia, da un punto di vista di utilità pratica, la necessità di ricorrere a metodiche di PCR target specifiche, i costi elevati e i tempi lunghi non rendono la metodica messa a punto mediante microarray una metodica facilmente utilizzabile da un punto di vista diagnostico. Potrebbe essere più pratico ricorrere ad amplificazione e successivo sequenziamento per l'identificazione del virus e del ceppo causa di malattia, soprattutto in considerazione dell'elevata probabilità di futura circolazione di ceppi virali nuovi, quali probabilmente quelli di WNV.

5) Produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali (Mabs) per l'impiego in saggi ELISA ed in metodi immunoistochimici; Sono stati selezionati 37 MAb dei quali 29 specifici per WNV e reattivi con tutti i ceppi testati e 8 cross-reattivi con altri Flavivirus. 13 MAb presentano attività neutralizzante e di questi, 12 riconoscono il medesimo epitopo localizzato sul dominio III della proteina E. Tutti i MAb sono risultati negativi in WB mostrando reattività per epitopi di tipo conformazionale. Il MAb 3B2 è stato selezionato per l'impiego nella diagnostica di laboratorio.

Conclusioni I MAb anti-WNV prodotti trovano largo impiego in diagnostica. Il 3B2 (neutralizzante e specifico per la proteina E dominio III), può essere impiegato in sandwich-ELISA per l'identificazione diretta di WNV e in ELISA competitiva per svelare anticorpi neutralizzanti anti-WNV in sieri equini e aviari. Inoltre, utilizzato come coniugato, trova impiego nella IgM capture ELISA per la diagnosi di infezioni recenti da WNV nel cavallo.

Per BDV sono stati selezionati 3 ibridomi e, successivamente, prodotti e purificati altrettanti Mabs in concentrazioni utili per la marcatura con perossidasi e l'allestimento del test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi virus specifici. L'ELISA competitiva sviluppata è stato utilizzato per testare 11 sieri equini BDV di riferimento, 8 dei quali positivi (titoli in immunofluorescenza indiretta tra 1/40 e 1/1280) e 3 negativi. con r anticorpi anti-BDV tramite. Il test ELISA ha permesso di identificare correttamente solo due dei tre sieri positivi ad alto titolo mentre ha mostrato una reattività scarsa o nulla per gli altri positivi. Anche in questo caso i Mabs riconoscono epitopi conformazionali, non reagendo con antigeni virali presenti in cellule infette (linea C6) fissate in formalina.

6) Validazione preliminare dell'ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi per WNV mediante realizzazione di un circuito interlaboratorio: Il circuito cui hanno partecipato tutte le UUOO del progetto ha fornito le indicazioni attese rispetto alle caratteristiche del metodo messo a punto, risultato quindi idoneo per lo scopo prefissato.

In particolare, i reagenti sviluppati e distribuiti sono stabili in quanto i valori di densità ottica dei controlli di reazione si sono mantenuti costanti nel tempo in cui sono stati eseguiti i tre set di prova.

L'**accuratezza** del test è adeguata, in quanto la sensibilità e la specificità sono risultate pari al 100%, indicando ottime qualità diagnostiche ed i valori di K di Cohen e di K multiplo indicano un accordo da sostanziale a quasi perfetto rispetto all'atteso.

La ripetibilità è risultata buona sia in termini quantitativi in considerazione dei modesti valori dei coefficienti di variazione (CV), sia qualitativi in quanto l'accordanza è risultata prossima al 100% per la maggior parte dei sieri impiegati nel pannello distribuito.

Anche la **riproducibilità** qualitativa ha fornito analoghe caratteristiche sia per quanto riguarda i CV di ogni siero all'interno dei singoli laboratori, considerando le differenti prove, sia i CV di ogni siero tra i laboratori con l'insieme di tutte le prove. I valori di concordanza secondo Langton, come per l'accordanza, sono prossimi al 100% per più della metà dei sieri.

La **COR (Concordance Odds Ratio)** è risultata essere prossima ad uno per tutti i sieri ad eccezione di due. Il valore di K secondo Quatto è risultato essere 0,76, indice di un accordo sostanziale.

Si può pertanto concludere che per tutti i parametri valutati il prodotto ha dato risultati molto soddisfacenti. Il completamento della validazione secondo i criteri OIE, dovrà essere condotto integrando i dati con l'analisi di un maggior numero di sieri di campo e verificando la specificità del metodo anche con campioni positivi per altri flavivirus circolanti nel nostro territorio (Usutu virus).

MODIFICHE APPORTATE AL PROGETTO IN CORSO D'OPERA

La scarsa sensibilità dimostrata dal prototipo di ELISA messo a punto per la ricerca di anticorpi nei confronti del BDV non ha consentito lo sviluppo di una metodica adatta all'impiego diagnostico e, di conseguenza il test non è stato sottoposto alla stessa stregua degli altri ad un circuito interlaboratorio per la sua validazione.

Inoltre, sia i monoclonali per WNV che per BDV riconoscono epitopi conformazionali e non sono idonei alla reazione immunoistochimica, questo è stato provato cimentando i sieri su cellule infette con WNV (linee Vero e BHK 21) che con BDV (linea C6) fissate in formalina.

Per tale motivo non si è potuto utilizzarli in routine ai fini della messa a punto e validazione dei metodi di immunoistochimica da parte delle UUOO 3 e 13 e pertanto anche detta fase del progetto non ha potuto aver luogo.

In alternativa, al fine di valutare la presenza e la possibile diffusione di infezioni da BDV, è stata effettuata un'indagine sieroepidemiologica su campioni di equidi autoctoni allevati in situazioni ambientali simili a quelle dei paesi europei in cui è stata descritta la presenza della malattia e confinanti con gli stessi, impiegando la metodica dell'immunofluorescenza indiretta.

La negatività di tutti i campioni sottoposti ad esame, diversamente da quanto descritto nel corso di precedenti osservazioni (Codazza D. e Nativi D., 2005), indicherebbe l'assenza di circolazione virale nelle aree sottoposte a controllo (Province di Trento e Bolzano).

MODALITA' DI DIVULGAZIONE

I risultati della ricerca sono stati divulgati attraverso comunicazioni e pubblicazioni scientifiche in ambito nazionale ed internazionale i cui fruitori sono stati gli addetti alla diagnostica ed alla ricerca nel campo delle malattie virali e delle zoonosi degli istituti zooprofilattici ed universitari. Tutta la rete dei laboratori degli Istituti zooprofilattici

dispone, oggi di metodi altamente sensibili e validati da impiegare nell'ambito delle attività di controllo e sorveglianza.

I report di validazione sono inoltre stati inviati e resi disponibili a gli uffici competenti della Direzione generale Sanità animale e farmaco veterinario del Ministero della Salute

Sono di seguito riportate in elenco i 18 contributi scientifici derivanti dalle attività di ricerca:

- 1) *VALIDAZIONE PRELIMINARE DI UNA ELISA COMPETITIVA IN FASE SOLIDA PER LA RICERCA DI ANTICORPI CONTRO IL WEST NILE DISEASE VIRUS (WNDV) IN SIERI EQUINI. R. Nardini, P.Cordioli, M. T. Scicluna, D. Lelli, A. Caprioli, F. De Simone, R. Frontoso, F. Rosone, G. L. Autorino. Atti XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Sorrento (NA) 24 - 26 Ottobre 2012.*
- 2) *PRELIMINARY VALIDATION OF A SOLID- PHASE COMPETITIVE ELISA FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST WEST NILE DISEASE VIRUS IN HORSE SERA. G. L. Autorino, A. Caprioli, F. De Simone, R. Frondoso, D. Lelli, R. Nardini, F. Rosone, M. T. Scicluna, 2nd Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD) Kazimierz Dolny, Poland, 1-4 July 2012.*
- 3) *RIMODULAZIONE DEL PIANO PER LA VERIFICA DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA WEST NILE NELL'AREA URBANA DI ROMA NEL 2011*
G. L. Autorino, A. Caprioli, R. Nardini, U. Della Marta, R. Frontoso, F. Rosone, M. R. Viola, S. Gregnanini, M. Sala, M.T. Scicluna , Epivet, Orvieto, 2011
- 4) *RE-EMERGENCE OF WEST NILE DISEASE IN THE HORSE POPULATION OF CENTRAL ITALY. M.T. Scicluna, A. Caprioli, M. Sala, A. Barone, F. Rosone, E. Letizia, G. Manna, G. L.Autorino. 4th Annual Meeting EPIZONE-2010*
- 5) *CARATTERIZZAZIONE DI CEPPI DI EQUINE HERPEVIRUS TIPO 1 CIRCOLANTI IN ITALIA DAL 1990 AL 2010. Canelli E., Manna G., Catella A., Lelli D., Fontana R., Cardeti G., Autorino L., Cordioli P. Atti XII Convegno SIDiLV Genova 27-29 Ottobre 2010*
- 6) *VALIDATION OF NOVEL REAL-TIME PCRS FOR THE SIMULTANEOUS DIAGNOSIS OF THREE DIFFERENT VIRAL ENCEPHALOMYELITIS INFECTIONS OF HORSES M. Sala, A.Cersini, A. Damiani, M. T. Scicluna, G. Manna, V. Spallucci, A. Caprioli, M. I. Ciabatti, G. L. Autorino, ESVV – 8th International Congress of Veterinary Virology – August 2009 – Budapest*
- 7) *VIRUS WEST NILE: CARATTERIZZAZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI E POTENZIALE APPLICAZIONE NELLA DIAGNOSI DI LABORATORIO D. Lelli, A. Moreno, E. Brocchi, E. Sozzi, E. Canelli, G.L. Autorino, M.A. Jimenez-Clavero, P. Cordioli. Atti III Workshop Nazionale Nazionale Di Virologia Veterinaria, 11-12 giugno 2009 a Valenzano (BA)*
- 8) *DEVELOPEMENT OF A NOVEL REAL TIME RT-PCR FOR THE DETECTION OF THE NS2A GENE OF WEST NILE VIRUS (WNV) Cersini A., Ciabatti I.M., Damiani A., Manna G., Scicluna M.T., Autorino G.L. ESVV – 8th International Congress of Veterinary Virology – August 2009 – Budapest, 188*

- 10) *EVIDENCE OF A HUMORAL RESPONSE TO A NOVEL PROTEIN WARF4 EMBEDDED IN THE WEST NILE VIRUS NS4B GENE ENCODED BY AN ALTERNATIVE OPEN READING FRAME* G. Faggioni, A. Ciammaruconi, R. De Santis, A. Pomponi, M. T. Scicluna, K. Barbaro, L. Masuelli, G. L. Autorino, R. Bei and F. Lista *International Journal of Molecular Medicine* (2009)
- 11) *MICROARRAY PER L'IDENTIFICAZIONE SIMULTANEA DI EQUID HERPESVIRUS, WEST NILE VIRUS E BORNA DISEASE VIRUS IN EQUINI.* Lauzi S., Puglisi S., Giannino L., Pollera C. (2008). *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, LXII Convegno Nazionale, San Benedetto del Tronto, 24-26 Settembre, 137-138.*
- 12) *SET UP OF MICROARRAY TECHNIQUE FOR THE SIMULTANEOUS IDENTIFICATION OF VIRUSES CAUSING NEUROLOGICAL DISEASE IN HORSES.* Lauzi S., Giannino L., Puglisi S., Damin F., Pollera C., Ponti W. (2008). *Med-Vet-Net Abstract Book, 4th Annual Scientific Meeting, 11-14 June, St.Malo, France, 31*
- 13) *CLINICAL, SEROLOGICAL AND MOLECULAR INVESTIGATIONS OF EHV-1 AND EHV-4 IN 15 UNWEANED THOROUGHBRED FOALS* M. L. Marenzoni, F. Passamonti, K. Cappelli, F. Veronesi, S. Capomaccio, A. Verini Supplizi, C. Valente, G. Autorino, M. Coletti - *Veterinary Record* (2008) 162, 337-341
- 14) *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. *Atti X Convegno SIDiLV Alghero 22-24 Ottobre 2008, pag. 9-10*
- 15) *APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI REAL-TIME RT-PCR PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA DI BORNA* Cersini A., Damiani A., Amaddeo D., Manna G., Scicluna M.T., Cantile C., Autorino G.L. *Atti IX Convegno SIDiLV Roma 14-16 Novembre 2007, pag. 88-89*
- 16) *METODOLOGIE DI GENOTIPIZZAZIONE E DIAGNOSTICA MOLECOLARE PER IL SETTORE AGROALIMENTARE.* Giannino M.L., Lauzi S., Ponti W., Bonizzi L. (2007). *Applicazione della tecnologia DNA-microarray per la diagnosi e la caratterizzazione dei virus responsabili di neuropatologie negli equini. Workshop: , Parco Tecnologico Padano, Lodi 25 Ottobre 2007.*
- 17) *WEST NILE DISEASE: STUDIO TRASVERSALE NEI CAVALLI DEL PADULE DEL FUCECCHIO E VALUTAZIONE RETROSPETTIVA PER COORTE DI NASCITA NEL PERIODO 1999-2006.* M. Sala, M.T. Scicluna, G. Manna, C. Cocumelli, F. Susini, A. Santini, R. Ricchi, M. Selmi, A. Battisti, P. Cordioli, G. L. Autorino. *Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria, Abano Terme 13-14 settembre 2007. Rapporto Istisan Congressi 07/C5: 100-101*
- 18) *DEVELOPMENT OF A REAL-TIME PCR FOR THE DIFFERENTIAL DETECTION OF EQUINE HERPESVIRUS TYPE 1 AND TYPE 4* A. Damiani, I.M. Ciabatti, G. Cardeti, R. Lorenzetti, M.T. Scicluna, G.L. Autorino, D. Amaddeo *5th National Congress of the Italian Society of Virology Orvieto 19-21-settembre 2005*

ALLEGATO 1

ELABORATO TECNICO

*Realizzazione di PCR Real Time simultanee e di tecnologia microarray
per EHV 1, EHV 4, WNDV E BDV*

STUDIO DEI DIVERSI GENOMI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI BORNA (BDV) PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE REGIONI TARGET DA SOTTOPORRE AD AMPLIFICAZIONE

Il BDV presenta diverse caratteristiche tipiche. L'organizzazione del genoma e le sequenze nucleotidiche sono simili a quelle degli altri membri dell'Ordine dei *Mononegavirales*. In considerazione della replicazione e della trascrizione a livello nucleare, pur essendo un virus ad RNA, dell'elevata omologia di sequenza e dell'ampio spettro d'ospite, il BDV è classificato come unico virus all'interno dell'unico genere *Bornavirus* della famiglia *Bornaviridae* (Kolodziejek et al., 2005).

Il BDV è un virus ad RNA a unico filamento, non segmentato, a polarità negativa (NNS RNA virus) di circa 8.910 nucleotidi. L'RNA del BDV contiene 6 ORFs che codificano per 6 proteine: la nucleoproteina p40/p38 (proteina N), la fosfoproteina p24/p16 (proteina P), la proteina di matrice gp18 (proteina M), la glicoproteina dell'envelope gp94 (proteina G), la RNA polimerasi RNA dipendente p 190 (proteina L) e la sesta proteina recentemente descritta e denominata proteina X o p10 (Kolodziejek et al., 2005).

Le proteine N, P e L costituiscono il complesso della polimerasi virale, la cui funzione è regolata negativamente dalla piccola proteina regolatoria p10 (Tomonaga et al., 2002). La nucleoproteina N in particolare sembra svolgere un ruolo importante nel trasporto a livello nucleare del complesso ribonucleoproteico (RNP), in quanto si lega ad altre proteine virali, tra le quali la fosfoproteina P, ed è probabilmente una componente essenziale del complesso RNP stesso. Recentemente è stata dimostrata anche una sua attività nel trasporto del complesso RNP dal nucleo verso il citoplasma. La nucleoproteina presenta due isoforme con peso molecolare di 40 e 38 kDa (p40 e p38) (Berg et al., 1998).

Le differenze funzionali tra le due isoforme non sono del tutto note ma il segnale di localizzazione nucleare è presente solamente nell'isoforma p40. Anche la fosfoproteina P presenta un segnale di localizzazione nucleare e svolgerebbe la funzione di cofattore essenziale della polimerasi virale, come riportato per tutte le fosfoproteine dei NNS RNA virus. Questa proteina svolge probabilmente un ruolo importante nel trasporto nucleare del complesso RNP in associazione alla proteina N. Recentemente è stato dimostrato che si lega anche alla proteina p10 e questo legame sembra essere alla base della regolazione negativa dell'attività di replicazione virale svolta dalla stessa proteina p10. Infine, l'ORF che codifica per la proteina P codifica anche per una piccola proteina di 16 kDa, denominata P', la cui funzione è sconosciuta ma sembra essere diversa dall'attività della proteina P (Tomonaga et al., 2002).

I target maggiormente utilizzati per la diagnosi di BDV mediante PCR e per la caratterizzazione genetica dei *Bornavirus* sono rappresentati dalle regioni che codificano per la nucleoproteina (p40, proteina N) e per la fosfoproteina (p24, proteina P) (Berg et al., 2001, Kolodziejek et al., 2005; Hilbe, 2006; Schindler et al., 2006). In effetti, in letteratura sono riportati molti lavori in cui vengono applicati protocolli di RT-nested

PCR nell'ambito delle regioni p40 e p24 (Sorg et al., 1995; Nakamura et al., 1996; Dauphin et al., 2001; Vahlenkamp et al., 2002).

Per l'individuazione di target diversi da p40 e p24, è stata effettuata una ricerca sui ceppi di Borna Virus attualmente noti e sequenziati.

I ceppi selezionati (ceppoV, He/80, H1766, RW98 e ceppo vaccinale Dessau) presentano un elevato grado di omologia. Sono tutti virus che sono stati originariamente isolati da equini provenienti da aree endemiche, tra le quali soprattutto la Germania. A livello europeo, oltre alla Germania, il virus è endemico anche in Svizzera, Liechtenstein e Austria.

Recentemente però è stato identificato un ceppo di BDV austriaco, denominato No/98, che presenta una sequenza del genoma diversa da tutti gli altri ceppi di BDV (Nowotny et al., 2000).

Kolodziejek e collaboratori (Kolodziejek et al., 2005), hanno, inoltre, riportato la distinzione in gruppi genetici di BDV sulla base dell'origine geografica. Sono stati identificati ceppi tedeschi che circolano solamente in Baviera (simili al ceppo RW98), ceppi tedeschi che circolano in Baviera e Baden-Württemberg (simili al ceppo He/80), ceppi tedeschi che circolano nelle aree meridionali della Sassonia-Anhalt e zone confinanti settentrionali della Sassonia (simili al ceppo vaccinale Dessau), ceppi tedeschi che circolano in diverse regioni federali tra le quali soprattutto Turingia e Bassa Sassonia (simili ai ceppi V e H1766), e ceppi svizzeri, del Liechtenstein e ceppi austriaci (Pleschka et al., 2001; Kolodziejek et al., 2005; Durwald et al., 2006).

Schematizzando, i ceppi di Borna virus isolati dagli animali e da noi considerati per la ricerca delle regioni target da sottoporre ad amplificazione possono essere così riassunti:

- Borna V isolato nel 1920 dalla sospensione di cervello di cavallo proveniente dalla Bassa Sassonia, Germania (accession number AJ311521);
- Borna HE/80 isolato nel 1980 da colture cellulari infettate con materiale proveniente da un cavallo con sintomatologia specifica originario di Baden-Württemberg, Germania (accession number AJ311522);
- Borna H1766 isolato dalla sospensione di cervello di un cavallo proveniente dall'alta Sassonia, Germania (accession number AJ311523);
- Borna No/98 isolato dal cervello di un pony proveniente da una zona dell'Austria (Styria) dove la Borna Disease non è endemica (accession number AJ311524).

Consultando la letteratura è stata effettuata una accurata analisi delle sequenze genomiche dei quattro ceppi di riferimento. Secondo Kolodziejek e collaboratori (Kolodziejek et al., 2005), l'analisi delle sequenze genomiche di tali ceppi, condotta mediante multiallineamenti, ha mostrato:

- una identità di sequenza del 96%-99% per quanto riguarda p40, codificata da ORF1= nucleoproteina, dei ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- una identità di sequenza del 97%-99% per quanto riguarda p24, codificata da ORF2= fosfoproteina, dei ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- una identità di sequenza compresa tra l'80%-85% per quanto riguarda p40 e p24 per il Borna No/98 rispetto a Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766.

In un ulteriore lavoro scientifico (Pleschka,2001), l'analisi delle sequenze genomiche, condotta mediante multiallineamento, ha mostrato:

- una identità di sequenza compresa fra 95%-98% fra i ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- mentre il ceppo Borna No/98 presenta una identità di sequenza dell'81% rispetto a Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766.

Riassumendo, dall'analisi dei multiallineamenti riportati in letteratura si è potuto constatare che le regioni altamente conservate tra i ceppi sopra descritti sono:

- la ORF1 che codifica per p40 o nucleoproteina;
- la ORF2 che codifica per p24 (da alcuni autori denominata p23).

La probabile spiegazione per cui p40 e p24 mantengono stabile sia la loro sequenza nucleotidica che amminoacidica sta nel fatto che, *in vitro*, entrambe le proteine interagiscono tra di loro all'interno delle cellule in coltura infettate con il Borna Virus). Tra l'altro esistono molti studi in cui il complesso p40 e p24 interagiscono con la RNA Polimerasi virale per formare il complesso RNP (Berg et al., 1998).

Una volta stabilite le regioni conservate nell'ambito del genoma di Borna Virus, si è passati a ricercare in letteratura articoli in cui è stata utilizzata come tecnica diagnostica la Real-Time basata su primers disegnati sulle sequenze dei geni p40 e p24. In particolare, è stato sezionato un lavoro (Schindler et al., 2006) in cui l'amplificazione del cDNA, relativo al genoma di Borna Virus, è stato ottenuto utilizzando primers e sonde disegnate su specifiche regioni altamente conservate delle ORFs codificanti per p40 e p24 dei ceppi Borna V, Borna HE/80, Borna H1766 ed Borna No/98.

Schindler e collaboratori, per determinare la specificità dei primers e delle corrispondenti sonde, hanno impiegato come stampi per la reverse-trascrizione e per la Real-Time sia l'RNA genomico dei ceppi di Borna Virus (in particolare Borna V, Borna HE/80, Borna H1766) che l'RNA di virus sia strettamente che non strettamente correlati. Sono stati testati con risultato positivo i campioni di RNA totale estratto da colture cellulari infettate con i ceppi di Borna Virus (Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766) ed i campioni di RNA totale ricavato dal cervello di pecore e di cavalli che presentavano i sintomi tipici della malattia. I controlli hanno confermato il risultato negativo ed hanno incluso:

- diversi membri dell'ordine dei Mononegavirales che sono più strettamente correlati ai Borna Virus, tra cui Lyssa Virus (Rhabdoviridae), PIV-2 e CDV (Paramyxoviridae);
- alcuni dei virus più rappresentativi a genoma ad RNA con polarità positiva come, per esempio PEDV (Coronaviridae);
- virus con genoma a DNA e più precisamente CAV-2 (Adenovirus) e CPV-2 (Parvoviridae).

Per confermare la specificità dei primers e della sonda, i prodotti dell'amplificazione ottenuti con i primers p40 e p24, rispettivamente di 78 bp e 69 bp, sono stati impiegati

come query sequence per la ricerca in BLAST nella banca dati GenBank e tale ricerca ha mostrato un'altissima specificità per i ceppi Borna Virus.

Gli autori però ritengono che il ceppo Borna No/98, caratterizzato da una omologia di sequenza dell'80% rispetto agli altri tre ceppi di Borna (Borna V, Borna HE/80, Borna H1766), potrebbe non essere rivelato con queste combinazioni di primers e sonde dato che presenta un diverso nucleotide sia per quanto riguarda la sequenza del primer forward e sia per la sequenza del primer reverse.

Per quanto riguarda la sensibilità sono state attuate due strategie. La prima strategia ha lo scopo di stabilire il numero di molecole di DNA che rappresentano il templatato reverse trascritto (cDNA) rilevabile mediante le due diverse reazioni di Real-Time. Per attuare questa strategia sono state allestite una serie di diluizioni in base 10 di plasmidi in cui è stata clonata la ORF p40, oppure, la ORF p24. Tali diluizioni coprono un range che va da un massimo di 10^8 ad un minimo di 10^{-2} molecole di plasmide per reazione. La sensibilità è risultata essere di 10 molecole target per ciascuna delle due Real-Time.

La seconda strategia ha lo scopo di stabilire il numero delle cellule in coltura infettate dai tre ceppi di Borna Virus testati (Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766). Per effettuare questa strategia sono state allestite diverse diluizioni seriali partendo da 400 unità formanti placche (FFU=Focus Forming Units). In due serie indipendenti di esperimenti, i genomi di BDV sono stati rivelati con le due tecniche di Real-Time fino alle diluizioni 1:256 e 1:1024 delle cellule infettate, che corrispondono ad 1,5-0,4 FFU. Questo vuol dire che, con queste due coppie di primers e sonde, è possibile individuare una sola cellula infettata da Borna Virus su di un totale di circa 10^6 cellule non infettate.

SELEZIONE DEI PRIMERS IDONEI PER BDV PER L'IMPIEGO IN PCR-REAL TIME

Il protocollo sopra riportato ed elaborato da questa stessa ricerca bibliografica (Schindler et al., 2006) è stato considerato valido per il nostro scopo e quindi i primers e le sonde sono state da noi ordinate. Le sonde TaqMan sono state marcate con FAM (5-carbossifluorescina) come 5' reporter fluorescente e con TAMRA (6-carbossitetrametilrodamina) come 3' quencher.

Le sequenze dei primers e delle sonde impiegate sono di seguito riportate:

- p40 Borna Forward primer
5'-GGTTTAAACTATGATGGCAGCCTTA-3'
- p40 Borna Reverse primer
5'-GTGGATTAAACATCTGGAGTAGTGTAGC-3'
- p40 Borna Probe
5'-FAM-ACCGGCCATCCCATGGTGAGAC-TAMRA-3'
- p24 Borna Forward primer
5'-TCCCTGGAGGACGAAGAAGAT-3'
- p24 Borna Reverse primer
5'-CTTCCGTGGTCTTGGTGACC-3'
- p24 Borna Probe
5'-FAM-CCAGACACTACGACGGGAACGA-TAMRA-3'

Come metodo alternativo sono state selezionate ulteriori regioni conservate nel genoma di Borna Virus. Per la ricerca di tali regioni è stato effettuato il multiallineamento tra i genomi dei ceppi isolati negli animali: Borna V, Borna HE/80, Borna H1766 e Borna No/98. Il multiallineamento è stato ottenuto mediante il metodo CLUSTAL W ed utilizzando il programma Lasergene (DNASar Inc. version 5, Madison, WI, USA). Dall'analisi del multiallineamento è stato constatato che regioni interne alla ORF3, codificante per la matrixprotein (gene M), dei ceppi esaminati sono altamente conservate. Si è perciò deciso di considerare il gene M.

Prendendo come riferimento il gene M di Borna V sono state condotte due nuove analisi di multiallineamento:

- una prima analisi di multiallineamento considerando i ceppi di Borna strettamente correlati per quanto riguarda la loro omologia di sequenza (Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766);
- una seconda analisi di multiallineamento sui ceppi sopra riportati in più inserendo il ceppo Borna No/98 che presenta una certa variabilità di sequenza rispetto a Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766. Agendo in questo modo è possibile stabilire l'aumento della variabilità nella sequenza del gene M con l'introduzione del genoma di N/98.

Da entrambi i multiallineamenti è stata estrapolata la relativa sequenza consensus del gene M od ORF3 mediante l'utilizzo del programma Lasergene (DNASar Inc. version 5, Madison, WI, USA).

La sequenza consensus relativa al multiallineamento del gene M per i ceppi di Borna caratterizzati da una elevata omologia di sequenza (Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766) è stata analizzata mediante il programma Primer Express version 3.0 dell'Applied Biosystem. All'interno della sequenza consensus del gene M, il programma ha evidenziato una regione bersaglio perfettamente conservata in tutti e tre i ceppi di Borna Virus che si estende dal 17°esimo al 91°esimo nucleotide in cui i primers e la sonda sono perfettamente adiacenti. Inoltre i primers e la sonda individuati rispettano le condizioni riportate dallo stesso programma.

Le sequenze dei primers e della sonda sono le seguenti:

- Borna gene M forward che è compreso tra il 17°esimo ed il 39°esimo nucleotide 5'-CCTATGTGGAGCTCAAGGACAAG-3'
- Borna gene M reverse che è compreso tra il 65°esimo ed il 91°esimo nucleotide 5'-CTCCTACAAAGTCTATCTCAAGCATCA-3'
- Borna gene M probe che è compresa tra il 41°esimo ed il 63°esimo nucleotide **5'-FAM-TAATCGTCCCTGGATGGCCACA-TAMRA-3'**

La valutazione della specificità di questi stessi primers e della sonda è stata effettuata mediante una ricerca in BLAST in cui è stata valutata l'omologia di sequenza mediante la voce Nucleotide-Nucleotide BLAST (blastn) impiegando come query la stessa sequenza dei primers e delle sonde. Il risultato di tale ricerca in BLAST, considerando sia la sequenza dei primers che della sonda, ha mostrato che i primers presentano una

omologia di sequenza del 100% con i ceppi Borna V, Borna HE/80 ed Borna H1766, mentre esiste una certa variabilità di sequenza sia per il ceppo Borna No/98 isolato negli animali che per i ceppi di Borna Virus isolati nell'uomo (per esempio il ceppo RW98 riscontrato nel sangue di un paziente che presentava turbe del comportamento). La sonda, invece, presenta una omologia di sequenza del 100% sia con tutti i ceppi di Borna Virus isolati negli animali che con i ceppi isolati in pazienti umani.

I primers e la sonda non presentano alcuna omologia di sequenza con Virus ad RNA strettamente correlati appartenenti all'ordine dei Mononegavirales come i Rhabdoviridae ed i Paramyxoviridae.

Sono stati disegnati ulteriori primers e sonda in grado di rilevare anche il ceppo No/98 caratterizzato da una minore omologia di sequenza rispetto ai ceppi altamente conservati Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766.

Per il disegno dei primers degenerati e della sonda è stata utilizzata la sequenza consensus relativa al gene M od ORF3, ottenuta dall'analisi di multiallineamento delle sequenze genomiche dei ceppi Borna V, Borna HE/80, Borna H1766 e Borna No/98.

L'analisi della sequenza consensus effettuata tramite il programma Primer Express version 3.0 ha individuato la stessa identica disposizione dei primers e della sonda già trovata per i ceppi di Borna Virus altamente conservati, ossia dal 17°esimo al 91°esimo nucleotide del gene M. Una volta disegnati i primers e la sonda è stata valutata la loro variabilità di sequenza valutando:

- l'omologia di sequenza precedentemente effettuata in BLAST e relativa ai primers e sonda disegnati per i ceppi di Borna altamente conservati;
- il confronto tra la sequenza consensus dei ceppi di Borna altamente conservati ed il ceppo variabile di Borna (No/98).

Procedendo in questo modo è stato constatato che la sonda è costituita da nucleotidi perfettamente conservati tra i ceppi di Borna isolati negli animali (Borna V, Borna HE/80, Borna H1766 e Borna No/98). Mentre si riscontrano due sostituzioni nucleotidiche per la sequenza del primer forward (24°esimo e 27°esimo nucleotide) ed altrettante sostituzioni nucleotidiche per il primer reverse (62°esimo e 59°esimo nucleotide) analizzando la sequenza del gene M, compresa tra il 17°esimo ed il 91°esimo nucleotide, per il ceppo No/98.

Da tutte queste considerazioni sono stati elaborati primers degenerati in grado di rilevare tutti i ceppi presi in considerazione, mentre la sonda è rimasta invariata:

- Borna gene MD forward che si estende dal 17°esimo al 39° nucleotide
5'-CCTATGTRGARCTCAAGGACAAG-3'
- Borna gene MD reverse che si estende dal 65°esimo al 91°esimo nucleotide
5'-CYCCWACAAAGTCTATCTCAAGCATCA-3'
- Borna gene M probe
5'-FAM-TAATCGTCCCTGGATGGCCCACA-TAMRA-3'

Tutti questi primers e sonde sono stati ordinati e verranno utilizzati per la messa a punto di un adeguato protocollo di Real Time PCR.

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI REAL TIME RT-PCR PER LA DIAGNOSI DI BDV

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ASSOLUTA E RELATIVA DELLE PCR REAL TIME PER BDV NEI CONFRONTI DI DIVERSI AGENTI EZIOLOGICI E, OVE POSSIBILE, RISPETTO A METODI DI CONFRONTO

Primers impiegati.

Per la messa a punto del test Real Time RT-PCR sono state selezionate regioni conservate nel genoma di BDV diverse da quelle codificanti per p24 e p40. Per la ricerca di tali regioni è stato effettuato il multiallineamento tra i seguenti genomi dei ceppi isolati negli animali : Borna V (GenBank accession number AJ311521), Borna HE/80 (GenBank accession number AJ311522), Borna H1766 (GenBank accession number AJ311523) e Borna No/98 (GenBank accession number AJ311524). Il multiallineamento è stato ottenuto mediante il metodo CLUSTAL W ed impiegando il programma Lasergene (DNA Star Inc. version 5, Madison WI, USA). Dall'analisi del multiallineamento è stato verificato che le regioni interne alla ORF3, codificante per la matrix protein (gene M/p16), dei ceppi esaminati sono altamente conservate. La sequenza consensus del gene M è stata così analizzata mediante il programma Primer Express version 3.0 Applied Biosystem ed è stata evidenziata una regione bersaglio conservata nei ceppi analizzati che si estende dal 17°esimo al 91°esimo nucleotide in cui i primers e la sonda sono perfettamente adiacenti. Le sequenze dei primers e della sonda sono le seguenti :

5'-CCTATGTGGAGCTCAAGGACAAG-3'(forward primer)

5-CTCCTACAAAGTCTATCTCAAGCATCA-3'(reverse primer)

5'-FAM-TAATCGTCCCTGGATGGCCACA-TAMRA-3'(probe)

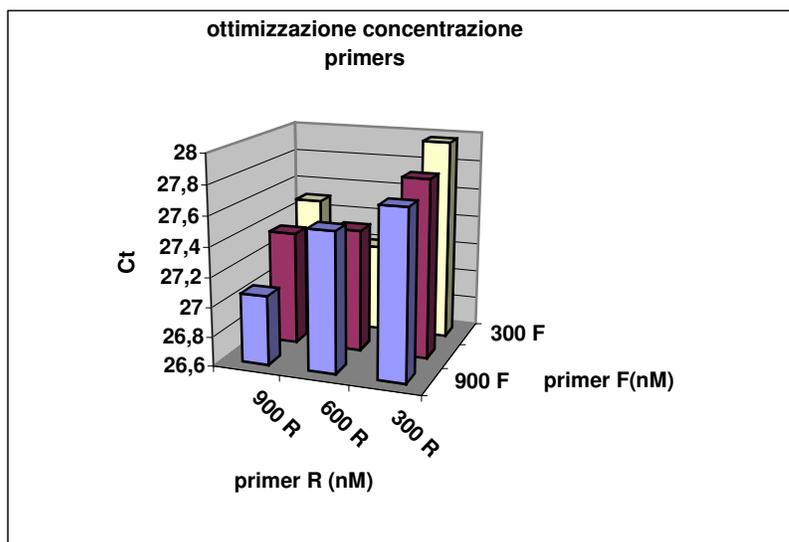
Ottimizzazione del saggio di Real Time RT-PCR.

L'ottimizzazione del saggio ha richiesto l'utilizzo di una serie di combinazioni di diverse concentrazioni di primers riportate nella tabella

Primer forward	Primer reverse
900 nM	900 nM
600 nM	600 nM
300 nM	300 nM
900 nM	600 nM
900 nM	300 nM
600 nM	900 nM
600 nM	300 nM
300 nM	900 nM
300 nM	600 nM

Ogni combinazione delle concentrazioni di primers è stata analizzata in duplicato impiegando come stampo sia l'RNA totale estratto dalle cellule RK13 infette con il ceppo H1766 che diluizioni in base 10 dell'RNA relativo al gene M trascritto in vitro.

Figura 1: Ottimizzazione delle concentrazioni dei primers.



Il migliore Ct (Ct = 27,6) è relativo alla concentrazione di 900 nM per entrambi i primers ed è stato ottenuto sia con l'RNA totale estratto dalle cellule RK13 infette con il ceppo H1766 che con la diluizione 106 dell'RNA relativo al gene M trascritto in vitro.

Saggio Real Time RT-PCR

E' stato utilizzato il kit one step RT PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) e la composizione della master mix è di seguito riportata in tabella

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μl	Concentrazione finale
H ₂ O DEPC	4,85 μl	
TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 μl	1X
Primer Borna gene M Forward (30 μM)	0,75 μl	900 nM
Primer Borna gene M Reverse (30 μM)	0,75 μl	900 nM
Probe gene M (10 μM)	0,5 μl	200 nM
40 X Multi Scribe™ and RNase Inhibitor Mix	0,65 μl	1X
Stampo	5 μl	
Volume finale	25 μl	

L'amplificazione è stata effettuata impiegando lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystem) e consiste in 30' a 48°C (reazione di retrotrascrizione), 10' a 95°C (attivazione della DNA polimerasi), seguita da 50 cicli composti da 95°C per 15'' e 60°C per 1'.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ASSOLUTA DELLA REAL TIME RT-PCR

La valutazione della sensibilità assoluta della Real Time RT-PCR ha comportato la sintesi in vitro dell'mRNA relativo al gene M.

Produzione dell'mRNA relativo al gene M

La sintesi dell'mRNA relativo al gene M ha comportato diversi passaggi:

- amplificazione mediante RT-PCR (One Step RT-PCR kit, Qiagen) del frammento di 78 bp relativo al gene M compreso fra i primers selezionati;
- clonaggio del gene M (78 bp) all'interno del plasmide pCRII-TOPO (TOPO TA Cloning® Kit Dual Promoter, Invitrogen);
- trasformazione delle cellule competenti batteriche (One SHOT TOP 10);
- selezione delle colonie ottenute dalla trasformazione su terreno Luria Bertani addizionato con Ampicillina ed X-gal;
- estrazione del plasmide e controllo del gene M clonato mediante sia PCR con i primers specifici per il gene M e con i primers M13 che con digestione effettuata con gli enzimi di restrizione EcoRI ed EcoRV;
- linearizzazione del plasmide pCRII-TOPO in cui è stato clonato il gene M mediante taglio enzimatico con EcoRV (Roche);
- reazione di trascrizione dell'mRNA relativo al gene M clonato sfruttando il promotore SP6 (Mega script® T7/Sp6 Kit, Ambion);
- eliminazione del DNA plasmidico mediante trattamento dell'mRNA relativo al gene M sintetizzato con 2U di DNase I (Turbo DNA-free Kit, Ambion);
- purificazione dell'mRNA relativo al gene M sintetizzato con le Centri-Sep colonnine (Princeton Separations, INC);
- quantizzazione mediante lettura allo spettrofotometro;
- calcolo del numero delle molecole di mRNA relativo al gene M/μl applicando la seguente formula : $x \text{ grammi}/\mu\text{l di RNA sintetizzato} / [\text{lunghezza dell'RNA trascritto in nucleotidi} \times 340] \times 6.022 \times 10^{23}$

Il numero delle molecole di mRNA relativo al gene M sintetizzato è pari a $9,89 \times 10^{10}$ molecole/μl.

Allestimento di una serie di diluizioni per l'mRNA relativo al gene M

Una volta stabilito il numero di molecole dell'mRNA relativo al gene M, sono state effettuate una serie di diluizioni in modo tale che ciascuna diluizione corrisponde ad un determinato numero di molecole di mRNA-gene M.

Tabella n.3 : diluizioni e corrispondenti molecole di mRNA-gene M sintetizzato in vitro

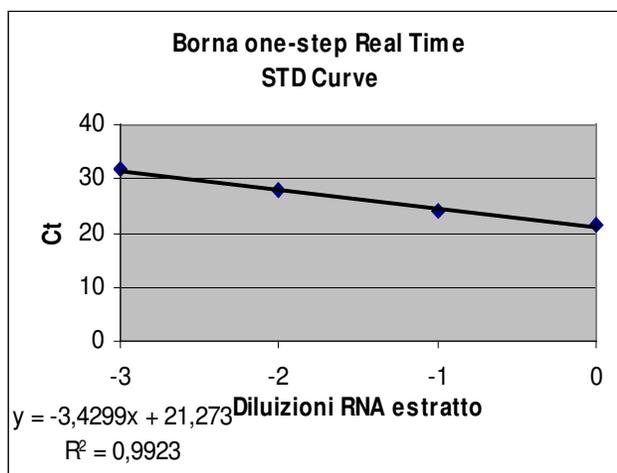
Diluizione	N° di molecole di mRNA-gene M sintetizzato in vitro.
10^1	1×10^7
10^2	1×10^6
10^3	1×10^5
10^4	1×10^4
10^5	1×10^3
10^6	1×10^2
10^7	1×10^1

Curva Standard della Real Time RT-PCR.

Per l'elaborazione della curva standard sono stati considerati due tipologie di campioni:

- una serie di diluizioni seriali che comprendono da un massimo di 10^7 molecole ad un minimo di 10 molecole;
- una serie di diluizioni seriali in base 10 dell'RNA totale estratto dalle cellule RK-13 infette.

Nella figura 2 è riportato il grafico relativo alla curva standard ottenuta impiegando i valori medi dei Ct delle quattro repliche di ciascun campione sia di mRNA relativo al gene M che di RNA totale esaminato estratto dalla linea cellulare RK-13 infetta.



Dalla figura si evince 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 ottimale funzionamento dei primers selezionati. L'efficienza del nostro test è stata calcolata secondo la formula $E = 10(-1/\text{slope}) - 1$, dove lo slope è pari a $-3,4299$, ed è risultata essere del 95%.

Inoltre, impiegando come stampi le diluizioni di mRNA, è stato appurato che la linearità del saggio di Real Time RT-PCR è compresa tra 10^7 e 10^2 molecole di mRNA-gene M.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ RELATIVA E DELLA SPECIFICITÀ DELLE DIVERSE PCR REAL TIME PER BDV NEI CONFRONTI DI CEPPI DI DIVERSA ORIGINE

Sensibilità relativa della Real Time RT-PCR nei confronti di diversi agenti eziologici.

Per la sensibilità relativa della Real Time RT-PCR sono stati testati i seguenti ceppi equini di BDV : H1766 ed HE/80. Come virus ad RNA a polarità positiva è stato considerato West Nile Virus (WNV), mentre come virus a DNA sono stati esaminati gli herpesvirus equini tipo 1 e tipo 4 (EHV-1 ed EHV-4). WNV, EHV-1 ed EHV-4 sono responsabili di forme neurologiche negli equini.

I primers selezionati non hanno amplificato regioni del genoma di WNV, EHV-1 ed EHV-4.

Sensibilità relativa della Real Time RT-PCR rispetto a metodi di confronto.

Per la sensibilità relativa sono state effettuate diluizioni seriali in base 10 dell'RNA totale estratto dalle cellule RK-13 infette. Ciascuna diluizione è stata analizzata sia con i primers relativi al gene M che con i primers p24 e p40. Questi ultimi due sono utilizzati per l'impiego di protocolli di Real Time RT-PCR specifici per BDV.

Nella Tabella n.4 sono riportati i valori della media dei Ct relativi alle 3 repliche per ciascuna diluizione dell' RNA totale estratto dalle cellule RK-13 infette.

STAMPO	Primers gene M	Primers p24	Primers p40
Dil.10 ¹	27,12	26,29	26,57
Dil.10 ²	30,53	29,92	30,27
Dil.10 ³	33,33	32,78	32,97

STUDIO DEI DIVERSI GENOMI VIRALI (EHV-1 ED EHV-4) PER LA SCELTA DELLE REGIONI TARGET DA SOTTOPORRE AD AMPLIFICAZIONE

Gli herpesvirus equini tipo 1 e tipo 4 (EHV-1, EHV-4), sono due Alphaherpesvirus responsabili della rinopolmonite equina, malattia che causa serie perdite nel settore dell'economia legato ai cavalli (Dunowska et al., 2002; Patel et al., 2005; Borchers et al., 2006; Kydd et al., 2006; Reilly et al., 2006). Possono provocare aborto (principalmente EHV-1), sindromi respiratoria (EHV-1 ed EHV-4), forme perinatali e neurologiche.

EHV-1 provoca malattia respiratoria ed è anche responsabile di aborti, forme perinatali e neurologiche. EHV-4 è associato principalmente a malattia respiratoria e raramente può provocare aborti e causare disturbi neurologici (Allen and Bryans, 1986; Oustlund et al., 1993; Crabb and Studdert, 1995; Verheyen et al., 1998; Smith et al., 2005; Slater et al., 2006).

Poiché la rinopolmonite equina è altamente contagiosa e può provocare l'insorgenza di focolai veri e propri con conseguenti casi di aborti e di disturbi neurologici, sono indispensabili test di laboratorio estremamente rapidi e sensibili per la diagnosi ed il controllo dell'infezione.

Attualmente esistono diversi mezzi per la diagnosi delle infezioni da EHV-1 ed EHV-4. Il classico isolamento virale nei tessuti in coltura seguito dalla identificazione tramite l'immunofluorescenza mediante l'impiego di anticorpi monoclonali specifici per il tipo virale è complesso e laborioso (Gunn, 1992).

Sono presenti in letteratura protocolli basati sulla reazione in catena della polimerasi (PCR) seguiti dall'analisi in gel di agarosio dei prodotti amplificati. In particolare sono state messe a punto nested PCR che utilizzano, come regioni target, il gene codificante per la glicoproteina B nel caso di EHV-1 (Varrasso et al., 2001; Allen et al., 2006) ed il gene codificante per la glicoproteina H nel caso di EHV-4 (Wagner et al., 1992; Borchers and Slater, 1993; Lawrence et al., 1994). Attualmente sono state sviluppate tecniche di Real Time PCR sia per EHV-1 che per EHV-4. Per entrambi i virus, i protocolli di Real Time utilizzano come regione target il gene per la glicoproteina B (Pusterla et al., 2005; Allen and Breathnach, 2006; Diallo et al., 2006; Elia et al., 2006; Hussey et al., 2006).

Per la ricerca delle regioni da sottoporre ad amplificazione abbiamo consultato e selezionato i genomi completi dei ceppi EHV-1 ed EHV-4 disponibili in GeneBank (EHV-1 ceppo Ab4p accession number AY665713, EHV-1 ceppo v592 accession number AY464052 ed EHV-4 ceppo NS80567 accession number AF030027) per individuare una regione conservata nei due tipi virali (Telford et al., 1992; Telford et al., 1998). Analizzando i genomi di questi ceppi è stato constatato che l'omologia di sequenza tra EHV-1 ed EHV-4 varia dal 55% al 84% ed è più marcata nella porzione di genoma che codifica per le principali glicoproteine (B, C, D, G, H, K, I ed E).

In dettaglio, andiamo ad osservare il grado di omologia per le principali glicoproteine di EHV-1 ed EHV-4 finora esaminate per la messa a punto di protocolli basati sulle tecniche di PCR:

- 83% per gB
- 78% per gD
- 80% per gH
- 81% per gE

Nell'OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals sono riportate due seminested PCR che utilizzano primers disegnati sulle sequenze del gene gH per EHV-1 e del gene gB per EHV-4. I geni gH ed gB non sono stati considerati per lo sviluppo di una specifica Real-Time PCR in quanto presentano una omologia di sequenza del 100% fra i ceppi EHV-1, ma un livello di omologia nettamente inferiore tra i ceppi EHV-4. L'attenzione si è quindi spostata sul gene gE che presenta un elevato grado di omologia anche tra i ceppi EHV-4.

SELEZIONE DEI PRIMERS IDONEI PER EHV-1 ED EHV-4 PER L'IMPIEGO IN PCR REAL TIME

L'allineamento delle sequenze sopra riportate ha evidenziato una regione omologa all'interno del gene gE utilizzando il metodo CLUSTAL W del programma Lasergene (DNASTAR Inc. version 5, Madison, WI, USA).

La sequenza consensus, relativa al gene gE, estrapolata dal multiallineamento è stata utilizzata per il disegno dei primers e delle sonde MGB (3' Minor Groove-Binding probe technology) impiegando il programma Primer Express Software (version 1.5, Applied Biosystems Foster City, CA, USA).

Sono state scelte le sonde MGB perché, formando strutture eteroduplex estremamente stabili con le sequenze bersaglio, permettono di discriminare in maniera altamente specifica tra EHV-1 ed EHV-4.

Le sequenze dei primers e delle sonde MGB sono di seguito riportate:

- EHV Taq Man forward che si estende dal 1111 al 1130°esimo nucleotide per EHV-1 e dal 1205 al 1224°esimo nucleotide per EHV-4
5'-CCACGGCTAGGAGAGCACTT-3'
- EHV Taq Man reverse che si estende dal 1208 al 1188°esimo nucleotide per EHV-1 e dal 1202 al 1182°esimo nucleotide per EHV-4
5'-CTRGTTCCAAGCTCCCAACTCT-3'
- EHV-1 MGB probe che impiega il colorante fluorescente FAM legato al reporter e si estende dal 1142°esimo al 1154°esimo nucleotide
5'-TCGGGCACAAAAT-3'
- EHV-4 MGB probe che impiega il colorante fluorescente VIC legato al reporter e si estende dal 1160°esimo al 1174°esimo nucleotide
5'-ATCCATCTGAGGCAACAA-3'

Come si può constatare, sono stati selezionati un singolo paio di primers per EHV-1 ed EHV-4 all'interno di una regione del gene gE altamente conservata e due sonde MGB

contenenti 4 mismatches nucleotidici se confrontate,rispettivamente, con la sequenza del gene gE dei ceppi EHV-4 ed EHV-1.

Il prodotto di amplificazione è di 97 bp e le due sonde MGB contengono reporter fluorescenti di diverso colore in modo tale da poterle discriminare.

La valutazione della specificità dei primers e delle sonde MGB è stata effettuata mediante una ricerca in BLAST in cui è stata valutata l'omologia di sequenza mediante la voce Nucleotide-Nucleotide BLAST (blastn) impiegando come query la stessa sequenza dei primers e delle sonde e dando un limite, per quanto riguarda il numero di genomi virali da consultare in GenBank,di 500 sequenze. Il risultato di tale ricerca, per quanto riguarda i primers, ha mostrato una omologia del 100% non soltanto con i ceppi considerati nell'allineamento ma anche con ulteriori ceppi di EHV-1 ed EHV-4 parzialmente sequenziali (EHV-1 ceppo Ab1, accession number M36299; EHV-4 ceppo TH20p, accession number AB005749).

MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO DI REAL TIME RT-PCR PER EHV-1 ED EHV-4

Primers impiegati per EHV-1 in Real Time PCR

Per la messa a punto del test di Real Time RT-PCR sono state ricercate regioni conservate all'interno del genoma di EHV-1 e nell'ambito dei geni che codificano per le principali glicoproteine: *gB*, *gC*, *gD*, *gG*, *gH*, *gK*, *gI* e *gE*.

Per la ricerca di tali regioni è stato effettuato il multiallineamento tra i seguenti genomi dei ceppi EHV-1 isolati negli equini: EHV-1 Ab4p (GenBank accession number AY665713), EHV-1 Ab1 (GenBank accession number AY10328), EHV-1 v592 (GenBank accession number AY464052) ed EHV-1 KyD ATCC VR-700 (GenBank accession number AY10330).

Il multiallineamento è stato ottenuto mediante il metodo CLUSTAL W ed impiegando il programma Lasergene (DNA Star Inc. version 5, Madison WI,USA).

Dall'analisi del multiallineamento è stato verificato che le regioni interne al gene *gE*, codificante per la glicoproteina E, dei ceppi esaminati sono altamente conservate.

La sequenza consensus del gene *gE* è stata così analizzata mediante il programma Primer Express version. 1,5 (Applied Biosystems) ed è stata evidenziata una regione bersaglio conservata nei ceppi analizzati che si estende dal 1111°esimo al 1208°esimo nucleotide in cui i primers e la sonda sono perfettamente adiacenti.

Le sequenze dei primers e della sonda MGB EHV-1 sono le seguenti:

5'-CCACGGCTAGGAGAGCACTT-3' (forward primer□EHV TaqMan Fw che si estende dal 1111°esimo al 1130°esimo nucleotide)

5'-CTRGTC AAGCTCCCAACTCT-3' (reverse primer□EHV TaqMan Rv che si estende dal 1208°esimo al 1188°esimo nucleotide)

5'-FAM-TCGGGCACAAAAT-TAMRA-3' (EHV-1 MGB probe che si estende dal 1142°esimo al 1154°esimo nucleotide)

Una perfetta complementarità di basi è stata trovata anche con la sequenza parziale del ceppo EHV-1 Ab1(GenBank accession number M36299).

Primers impiegati per EHV-4 in Real Time PCR

Per la messa a punto del test di Real Time RT-PCR sono state ricercate regioni conservate all'interno del genoma di EHV-4 e sempre nell'ambito dei geni che codificano per le principali glicoproteine: *gB*, *gC*, *gD*, *gG*, *gH*, *gK*, *gI* e *gE*.

Per la ricerca di tali regioni è stato effettuato il multiallineamento tra i seguenti genomi dei ceppi EHV-4 isolati negli equini: EHV-4 NS80567 (GenBank accession number AF030027) ed EHV-4 405/76 ATCC VR-2230 (GenBank accession number AY034650).

Il multiallineamento è stato ottenuto mediante il metodo CLUSTAL W ed impiegando il programma Lasergene (DNA Star Inc. version 5, Madison WI, USA).

Dall'analisi del multiallineamento è stato verificato che le regioni interne al gene *gE*, codificante per la glicoproteina E, dei ceppi esaminati sono altamente conservate come nei ceppi EHV-1 considerati.

La sequenza consensus del gene *gE* è stata così analizzata mediante il programma Primer Express version 1,5 (Applied Biosystems) ed è stata evidenziata la stessa regione bersaglio conservata nei ceppi analizzati che si estende dal 1111°esimo al 1208°esimo nucleotide in cui i primers e la sonda sono perfettamente adiacenti.

Va sottolineato che la sonda EHV-4 differisce per 4 nucleotidi (A in posizione 1175, G in posizione 1176, A in posizione 1179 ed A in posizione 1182) rispetto alla sonda EHV-1 e tale differenza è dovuta ad una variazione di sequenza che esiste tra gli stessi herpesvirus all'interno della stessa regione bersaglio considerata per entrambi i tipi di virus.

Le sequenze dei primers e della sonda MGB EHV-4 sono le seguenti:

5'-CCACGGCTAGGAGAGCACTT-3' (forward primer □ EHV TaqMan Fw che si estende dal 1111°esimo al 1130°esimo nucleotide)

5'-CTRGTC CAAGCTCCCAACTCT-3' (reverse primer □ EHV TaqMan Rv che si estende dal 1208°esimo al 1188°esimo nucleotide)

5'-VIC-ATCCATCTGAGGCAACAA-TAMRA-3' (EHV-4 MGB probe che si estende dal 1166°esimo al 1183°esimo nucleotide)

Una perfetta complementarità di basi è stata trovata anche con la sequenza parziale del ceppo EHV-4 1942 (GenBank accession number D00318).

PROTOCOLLI DI SEMINESTED-PCR PER LA DIAGNOSI DI EHV-1 ED EHV-4 IMPIEGATI PER LO STUDIO DELLA SENSIBILITÀ RELATIVA

Primers utilizzati in seminested PCR per EHV-1 ed EHV-4

È stato impiegato e modificato un protocollo selezionato in letteratura (Varasso A. et al.; Australian Veterinary Journal (2001), Vol.79:563-569) che prevede l'amplificazione mediante la tecnica di seminested PCR dei segmenti codificanti per la glicoproteina H nel caso di EHV-1 e per la glicoproteina B nel caso di EHV-4.

Tale metodo permette di ottenere prodotti di differenti dimensioni: 287 bp per EHV-1 e 323 bp per EHV-4.

Primers **EHV-1** per la seminested PCR

EHV-1 forward: 5'-AAGAGGAGCACGTGTTGGAT-3'

EHV-1 reverse: 5'-TTGAAGGACGAATAGGACGC-3'

EHV-1 seminested RN: 5'-AGTAGGTCAGGCCGATGCTT-3'

Primers **EHV-4** per la seminested PCR

EHV-4 forward: 5'-CTGCTGTCATTATGCAGGGA-3'

EHV-4 reverse: 5'-CGTCTTCTCGAAGACGGGTA-3'

EHV-4 seminested RN: 5'-CGCTAGTGTCATCATCGTCG-3'

Composizione della Master mix seminested PCR per EHV-1 ed EHV-4

Dopo diverse prove, le condizioni ottimali di amplificazione e concentrazione dei reagenti che hanno dato risultati riproducibili sono qui di seguito descritte partendo dalla preparazione dello stampo.

Per quanto riguarda la preparazione dello stampo, 100 μ l di materiale (estratti da organi, surnatante di colture cellulari o tamponi nasali filtrati) sono stati sottoposti a 95°C per 20 minuti e centrifugati a 13000 g per 5 minuti; successivamente, nella miscela di amplificazione sono stati impiegati 5 μ l del surnatante sia tal quale che diluito 1:10 in H₂O sterile.

Per quanto riguarda la composizione della miscela di reazione, i componenti impiegati sono stati: 15mM Tris-HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 0,1% Triton X-100 (ICN), 200 μ M di ogni dNTP, 0,6 μ M dei primers forward e reverse, 1,5mM MgCl₂, 0,5U AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems), 5 μ l di stampo e X μ l di H₂O ultrapura sterile necessaria per arrivare ad un volume di 50 μ l.

Condizioni di amplificazione seminested PCR per EHV-1 ed EHV-4

La reazione di amplificazione è stata condotta in GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni: denaturazione a 95°C per 5 minuti; 35 cicli composti da 30 secondi di denaturazione a 95°C, 30 secondi di appaiamento ed amplificazione a 60°C e 1 minuto di estensione a 72°C; 5 minuti di estensione finale a 72°C.

Per la seconda amplificazione (seminested), 1 μ l del prodotto della prima amplificazione è stato utilizzato come stampo nelle stesse condizioni ad eccezione dei primers che sono i primers forward e seminested RN sopra descritti.

Virus e cellule utilizzate

Come controlli sono stati impiegati il ceppo KyD di EHV-1 (ATCC VR-700) ed il ceppo 405/76 di EHV-4 (ATCC VR-2230).

Come substrato cellulare rispettivamente di EHV-1 ed EHV-4 sono state impiegate le colture cellulari RK13 ed ED.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ASSOLUTA DELLE SEMINESTED PCR PER EHV-1 ED EHV-4

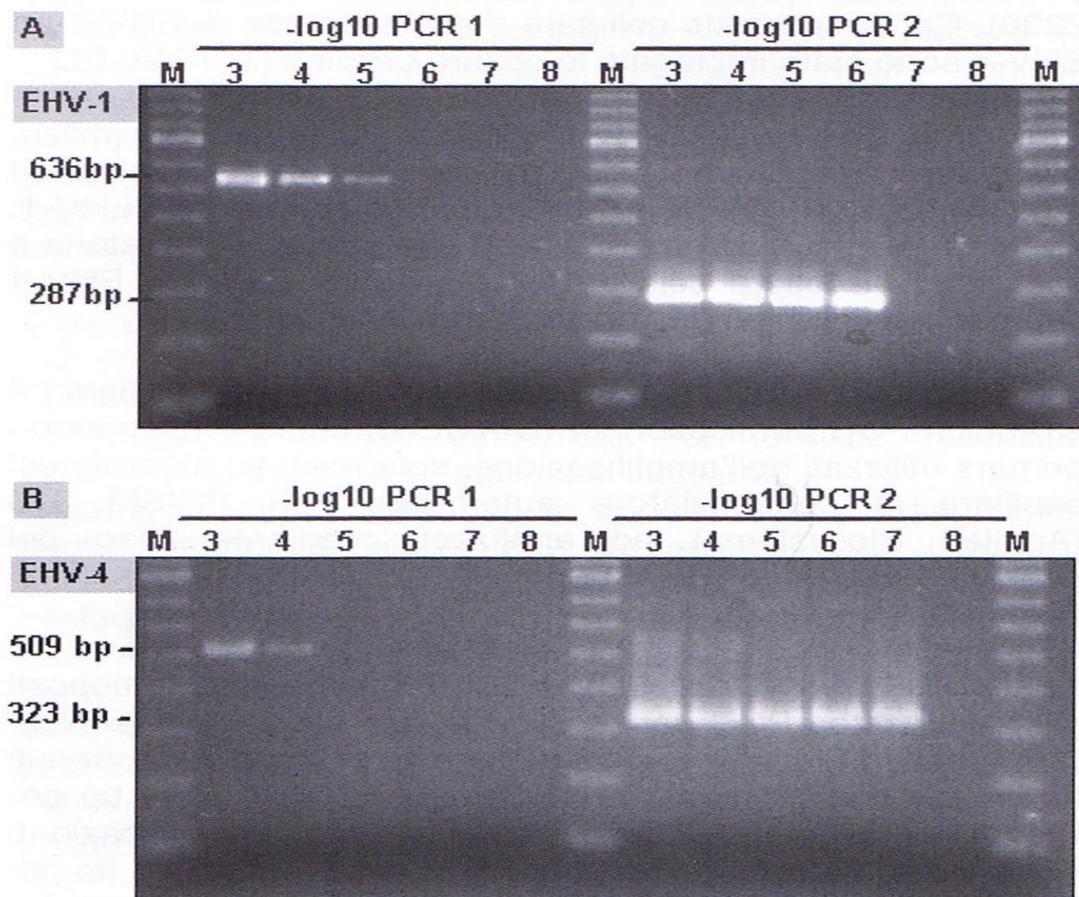
La valutazione della sensibilità assoluta ha comportato l'allestimento di una serie di diluizioni in base 10 (da 10^{-1} a 10^{-8}) di EHV-1 (Fig.1A) ed EHV-4 (Fig.1B) che sono state poi analizzate in PCR.

Con la prima amplificazione, la banda di 636bp specifica per EHV-1 è stata ottenuta fino alla diluizione 10^{-5} e la banda di 509bp specifica per EHV-4 è stata rilevata fino alla diluizione 10^{-4} .

Con la seconda amplificazione, sono stati ottenuti i frammenti di 287bp per EHV-1 e di 323bp per EHV-4, rispettivamente fino alle diluizioni 10^{-6} e 10^{-7} .

Pertanto, la seconda amplificazione incrementa di 10 volte la sensibilità per EHV-1 e di 1000 volte per EHV-4.

Figure 1A ed 1B: *Sensibilità assoluta delle PCR EHV-1 ed EHV-4*



VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ RELATIVA DELLE SEMINESTED PCR PER EHV-1 ED EHV-4 RISPETTO ALL'ESAME COLTURALE

Per confrontare la sensibilità della tecnica con quella dell'isolamento in coltura, le stesse diluizioni in base 10 di EHV-1 ed EHV-4 sono state inoculate su monostrati cellulari di RK13 per EHV-1 e di ED per EHV-4.

Sia per EHV-1 che per EHV-4, l'effetto citopatico è stato osservato fino alla diluizione 10^{-5} .

Concludendo, nelle nostre condizioni, le seminested PCR si dimostrano rispettivamente 10 volte e 100 volte più sensibili dell'isolamento in coltura di EHV-1 e di EHV-4.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ RELATIVA DELLE SEMINESTED PCR PER EHV-1 ED EHV-4 NEI CONFRONTI DEI CEPPI DI DIVERSA ORIGINE

Per la sensibilità relativa delle seminested PCR sono stati testati diversi tipi di Herpesvirus: herpesvirus canino tipo1, herpesvirus caprino tipo1, herpesvirus bovino tipo1 ed herpesvirus del suino tipo 1.

I primers selezionati non hanno amplificato regioni del genoma degli herpesvirus testati.

VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DELLE SEMINESTED PCR PER EHV-1 ED EHV-4

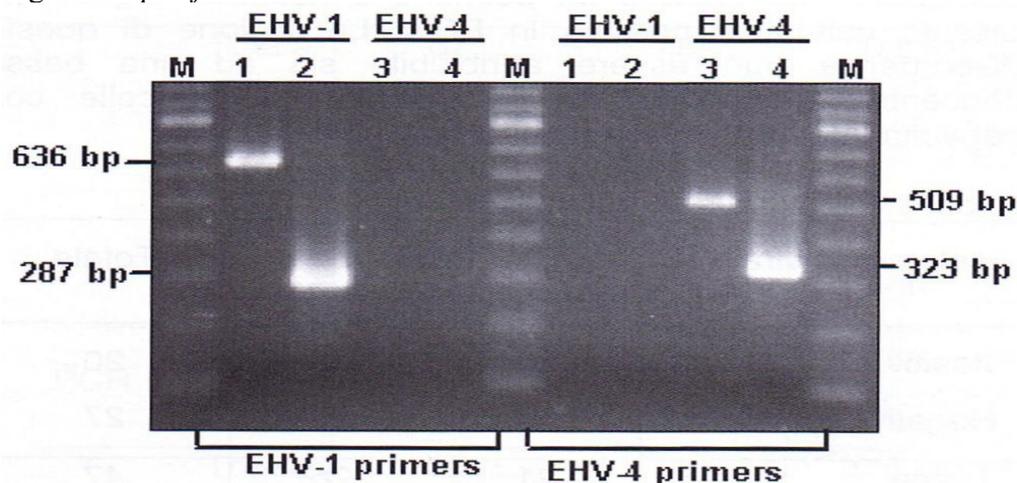
I ceppi EHV-1 KyD ed EHV-4 405/76 sono stati sottoposti alla seminested PCR per valutare la specificità della tecnica.

Come già sopra descritto, dopo la prima amplificazione sono stati ottenuti i frammenti corrispondenti a 636bp per EHV-1 e 509bp per EHV-4 (Fig.2).

Dopo la seconda amplificazione (seminested), sono stati ottenuti i prodotti attesi di 287bp per EHV-1 e 323bp per EHV-4 (Fig .2).

L'identità degli amplificati è stata ulteriormente verificata mediante sequenziamento dei prodotti finali delle seminested PCR.

Figura 2: Specificità delle PCR EHV-1 ed EHV-4



OTTIMIZZAZIONE DEL SAGGIO DI REAL TIME PCR PER EHV 1 ED EHV-4

L'ottimizzazione del saggio ha richiesto l'utilizzo di una serie di combinazioni di diverse concentrazioni di primers e sonde riportate nelle tabelle 1 e 2.

Tabella 1: Combinazioni delle concentrazioni dei primers

Primer forward	Primer reverse
900 nM	900 nM
600 nM	600 nM
300 nM	300 nM
900 nM	600 nM
900 nM	300 nM
600 nM	900 nM
600 nM	300 nM
300 nM	900 nM
300 nM	600 nM

Tabella 2: Combinazione delle concentrazioni delle sonde

EHV-1 MGB probe	EHV-4 MGB probe
60 nM	60 nM
120 nM	120 nM
240 nM	240 nM
300 nM	300 nM
60 nM	120 nM
60 nM	240 nM
60 nM	300 nM
120 nM	60 nM
120 nM	240 nM
120 nM	300 nM
240 nM	60 nM
240 nM	120 nM
240 nM	300 nM
300 nM	60 nM
300 nM	120 nM
300 nM	240 nM

Ogni combinazione delle concentrazioni dei primers e delle sonde è stata analizzata in triplicato impiegando come stampo i DNA estratti dalle diluizioni 10^4 dei virus stock EHV-1 ed EHV-4 che sono, rispettivamente, EHV-1 KyD (ATCC VR-700) con titolo $10^{7.2}$ ICD₅₀/ml ed EHV-4 405/76 (ATCC VR-2230) con titolo 10^7 TICD₅₀/ml.

Sono state scelte le concentrazioni dei primers e delle sonde che hanno dato ottimi segnali di fluorescenza con valori di Ct bassi e corrispondono a 900 nM primer EHV-Fw, 300 nM primer EHV-Rv, 120 nM probe EHV-1-MGB e 240 nM probe EHV-4.

SAGGIO REAL TIME PER EHV-1 ED EHV-4

E' stato utilizzato il kit TaqMan 2X PCR Master Mix (Applied Biosystems) e la composizione della master mix è riportata in tabella 3.

Tabella 3: Composizione Master Mix per 1 campione

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μ l	Concentrazione e finale
H ₂ O	5,6 μ l	
TaqMan 2X Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 μ l	1X
Primer EHV-Fw (30 μ M)	0,75 μ l	900 nM
Primer EHV-Rv (30 μ M)	0,25 μ l	300 nM
Probe EHV-1-MGB (10 μ M)	0,3 μ l	120 nM
Probe EHV-4-MGB (10 μ M)	0,6 μ l	240 nM
Stampo	5 μ l	
Volume finale	25 μ l	

L'amplificazione è stata effettuata impiegando lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) e consiste in 2 minuti a 50°C; 10 minuti a 95°C e da 40 cicli composti da 15 secondi a 95°C ed 1 minuto a 60°C.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ASSOLUTA DELLA REAL TIME PCR PER EHV-1 ED EHV-4

Allestimento di una serie di diluizioni e calcolo del LOD per la Real Time PCR per EHV-1 ed EHV-4

Il LOD del saggio di Real Time PCR è stato individuato amplificando il DNA estratto da una serie di diluizioni in base 10, che vanno da 10² a 10⁷, del ceppo EHV-1 KyD (10^{7.2} TICD₅₀/ml) e del ceppo EHV-4 405/76 (10⁷ TICD₅₀/ml).

Le diluizioni da 10² a 10⁷ sono state preparate in quadruplicato.

L'amplificazione della regione target è stata ottenuta per le serie di diluizioni EHV-1 ed EHV-4 che vanno da 10² a 10⁵, per cui il LOD della Real Time PCR è stato considerato essere di 22 (160 TICD₅₀/ml) e di 9 (63 TICD₅₀/ml) TCID₅₀, rispettivamente, per EHV-1 ed EHV-4.

Inoltre, i LOD riscontrati non sono affatto influenzati dalla presenza simultanea di entrambi i virus; in effetti gli stessi LOD sono rimasti invariati quando le diluizioni (da

10^2 a 10^7) di ciascun virus sono state testate in Real Time PCR in combinazione con 10^3 TCID₅₀ dell'altro virus.

Curve standard della Real Time PCR per EHV-1 ed EHV-4

Le curve standard sono state elaborate utilizzando una serie di diluizioni in base 10 dei DNA risultati positivi per EHV-1 e per EHV-4 ed impiegati per lo studio del LOD (Fig.3 e Fig.4).

Figura 3: Curva standard per EHV-1 (ciascun punto riportato nel grafico rappresenta il Ct medio di tre replicati per ciascuna diluizione).

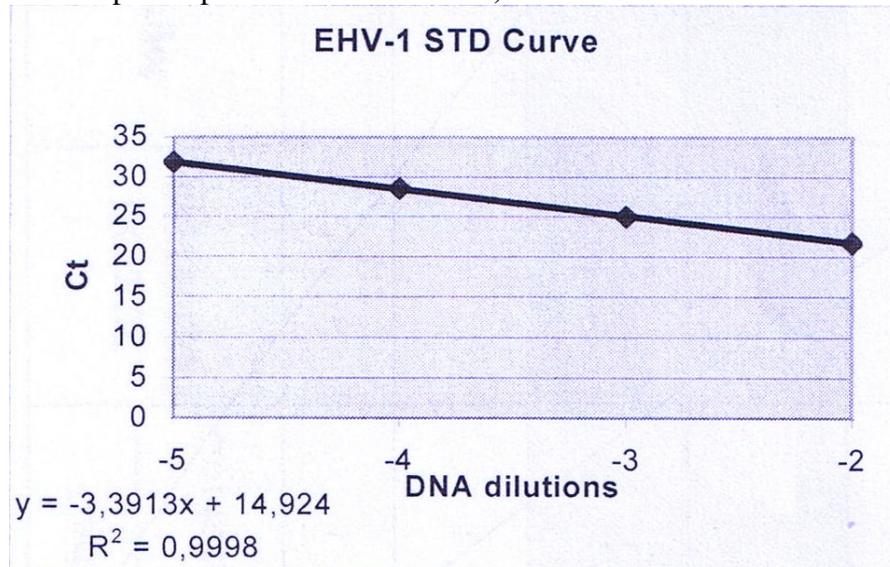
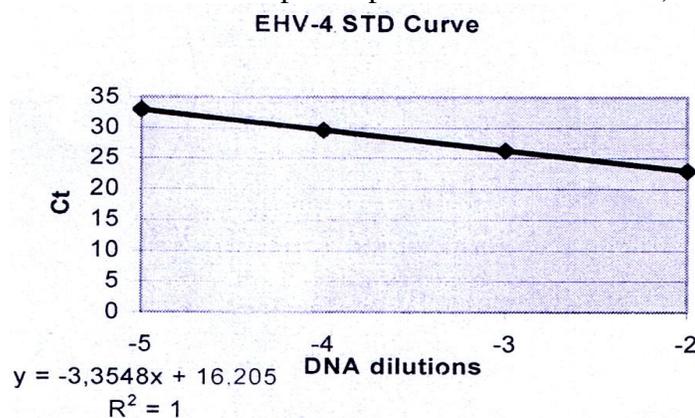


Figura 4: Curva standard per EHV-4 (ciascun punto riportato nel grafico rappresenta il Ct medio di tre replicati per ciascuna diluizione)



Una relazione lineare è stata osservata tra le concentrazioni di DNA ed i valori dei Ct con i coefficienti di correlazione (R^2) superiori a 0,99, indice di un ottimale 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 $-3,3913$ per EHV-1 e $-3,3548$ per EHV-4, di conseguenza l'efficienza della Real Time PCR è risultata essere del 97% e del 98%, rispettivamente, per EHV-1 ed EHV-4.

Ripetibilità della Real Time PCR per EHV-1 ed EHV-4

La ripetibilità del saggio è stata esaminata ripetendo separatamente e per tre volte ciascuna curva standard, sia quella relativa ad EHV-1 che ad EHV-4.

Il coefficiente di variazione (CV) dei valori dei Ct è risultato essere compreso tra lo 0,19% ed il 2,47%; ciò attesta l'elevata ripetibilità del saggio.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ RELATIVA E DELLA SPECIFICITÀ DELLA REAL TIME PCR PER EHV-1 ED EHV-4 NEI CONFRONTI SIA DI CEPPI DI DIVERSA ORIGINE CHE DELLE SEMINESTED PCR

Sensibilità relativa della Real Time PCR per EHV-1 ed EHV-4 nei confronti di diversi agenti eziologici

Per la sensibilità relativa della Real Time PCR sono stati impiegati i seguenti ceppi EHV-1 equini: EHV-1 KyD (ceppo isolato in USA-Kentucky), EHV-1 Ab4p (ceppo isolato in Gran Bretagna) ed i ceppi EHV-1 isolati in Italia tra il 1998 ed il 2003, vedi tabella 4.

Tabella 4: Ceppi equini isolati in Italia e testati in Real Time PCR

CEPPI EHV-1
EHV-1 741/V98
EHV-1 916 V-1/98
EHV-1 916 V-2/98
EHV-1 1287 V-1/98
EHV-1 1287 V-2/98
EHV-1 1385 V/99
EHV-1 1298 V/99
EHV-1 4677 IZS/01
EHV-1 10544 IZS/01
EHV-1 4907 IZS/02
EHV-1 10380
EHV-1 13438
EHV-1 T201C
EHV-1 17520C

Per quanto riguarda EHV-4 equino è stato impiegato il ceppo EHV-4 405/76 (ceppo isolato in Australia). Sono stati considerati ulteriori Herpesvirus isolati da altre specie animali e geneticamente correlati come: il ceppo bovino Herpesvirus type 1 (BHV-1), gli Herpesvirus caprini e gli Herpesvirus canini.

In ultimo, sono stati testati virus sintomatologicamente correlati ad EHV-1 e ad EHV-4: West Nile virus (WNV), virus dell'influenza equina (EIV), il virus dell'arterite equina (EAV) ed il virus della Pseudorabbia.

I primers e le sonde sono risultati altamente specifici poiché amplificano la porzione dei genomi degli EHV-1 e degli EHV-4 equini compresa tra gli stessi primers selezionati.

Sensibilità relativa della Real Time rispetto alle Seminested PCR

Per la sensibilità relativa sono state effettuate diluizioni seriali in base 10 dei DNA totali estratti dalle cellule RK13 infette con EHV-1 KyD (ATCC VR-700) e dalle cellule ED infette con EHV-4 405/76 (ATCC VR-2230).

Per ottenere le analisi comparative, gli stessi stampi di DNA sono stati analizzati mediante la Seminested PCR EHV-1 e la Seminested PCR EHV-4.

Come osservato per il saggio di Real Time PCR, le diluizioni da 10^2 a 10^5 sono risultate positive in tutti i replicati mostrando così che la Real Time PCR è sensibile quanto le Seminested PCR.

ESAME DEI CAMPIONI CLINICI PER EHV-1 ED EHV-4

Per quanto riguarda i campioni clinici sono stati analizzati, sia in Real Time PCR che con entrambe le Seminested PCR, i DNA estratti da 26 campioni di tessuti fetali (placenta, polmone, trachea, fegato, milza e rene), da 28 tamponi nasali prelevati da soggetti con evidenti segni clinici della malattia respiratoria e da 14 ceppi isolati nelle apposite colture cellulari inoculate con il materiale patologico (vedi tabella 5).

Tabella 5: Confronto tra la Real Time PCR e le Seminested PCR specifiche per EHV-1 ed EHV-4

Campioni	Real Time PCR per EHV-1	Seminested PCR per EHV-1	Real Time PCR per EHV-4	Seminested PCR per EHV-4
26 tessuti fetali	12 positivi	12 positivi	1 positivo	1 positivo
28 tamponi nasali	7 positivi	7 positivi	1 positivo	1 positivo
14 virus isolati in colture cellulari	14 positivi	14 positivi	0 positivi	0 positivi

Concludendo, è stato riscontrato il 100% di concordanza tra i risultati della Real Time PCR e delle Seminested PCR specifiche per EHV-1 ed EHV-4.

STUDIO DEI DIVERSI GENOMI VIRALI PER L'IDENTIFICAZIONE DELLE REGIONI TARGET DEL VIRUS WEST NILE DA SOTTOPORRE AD AMPLIFICAZIONE

Il West Nile Virus (WNV) è classificato all'interno del genere *Flavivirus* della famiglia *Flaviviridae*. E' costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva lineare di 11.029 nucleotidi. 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 (polimerasi) (Poidinger M. Et al., 1996; Brinton et al., 2002).

I *Flavivirus* sono distinti in tre gruppi in base alla modalità di trasmissione: *tick-borne viruses*, *mosquito-borne viruses* e virus per i quali non è stato identificato un artropode vettore. I virus appartenenti ai tre gruppi sono ulteriormente divisi in 12 sierogruppi. Il WNV è compreso nel sierogruppo del virus dell'Encefalite Giapponese che include anche i patogeni per l'uomo quali il *Japanese encephalitis virus*, il *Murray Valley Encephalitis virus*, con il ceppo *Alfuy virus*, il *St. Louis encephalitis virus* ed il *Kunjin virus*, nonché altri virus quali *Cacipacore virus*, *Koutango virus*, *Usutu virus* e *Yaounde virus*. Sulla base dell'omologia di sequenza genomica, il Kunjin virus, endemico in Australia ed in Asia, è ora considerato un ceppo del WNV (Van Regenmortel et al., 2000).

Attualmente i dati a disposizione sulla caratterizzazione sierologia e genetica suddividono i ceppi West Nile Virus in due linee genetiche: tutti gli isolati di WNV responsabili di epidemie umane appartengono alla linea genetica 1, mentre i virus della linea genetica 2 sono ristretti ad infezioni endemiche in Africa ed Madagascar e non sono stati associati ad encefaliti nell'uomo (Tsai et al., 1998; Savage et al., 1999)

Tutti i West Nile Virus appartenenti alla prima linea genetica sono caratterizzati dal fatto di presentare le proteine dell'envelope (prM protein ed envelope protein) glicosilate. Tale caratteristica contribuisce a rendere il fenotipo fortemente virulento e ciò è stato confermato sperimentalmente in studi condotti sul modello murino in cui basse dosi del ceppo NY99 di WNV, inoculate nel circolo periferico, ne determinano la morte per encefalite nell'arco delle 12 ore post-infezione (Borisevich et al., 2006). Inoltre, i virus appartenenti alla linea genetica 1 si distinguono in tre cluster virali: al primo cluster appartengono i ceppi di WNV isolati in Africa, Medio Oriente, Europa e Nord America, nel secondo cluster sono raggruppati i ceppi di Kunjin virus isolati in Australia e del terzo cluster fanno parte i ceppi di WNV isolati in India (Berthet et al., 1997; Scherret et al., 2001).

Recentemente sono stati identificati due virus WNV, RabV 97-103 e RabV 99-222, con caratteristiche genetiche diverse tra loro e diversi tra i WNV fino ad oggi identificati. Il ceppo RabV mostra una identità di sequenza nucleotidica soltanto del 75%-77% ed una identità aminoacidica dell'89%-90% con i ceppi WNV rappresentativi della linea

genetica 1 e 2. Per questi nuovi WNV è stata proposta una classificazione di WNV della linea genetica 3 e della linea genetica 4 (Bakonyi et al., 2005).

Per individuare i target utilizzati per la diagnosi di WNV è stata condotta una ricerca bibliografica. Dalla letteratura è stato possibile valutare sia l'uso di tecniche di reverse transcription-PCR (RT-PCR), che impiegano come target le proteine strutturali come la proteina E (Ternovoi et al., 2006) e le proteine non strutturali tipo NS5 (Eisler et al., 2004), che l'utilizzo di tecniche di Real-Time PCR che usano primers e sonde specifiche per le proteine strutturali come ad esempio la proteina C del nucleocapside (Shirato et al., 2005).

Con lo scopo di comprendere meglio quali siano i target migliori da utilizzare per la diagnosi molecolare di WNV è stata effettuata una ricerca bibliografica in modo tale da esaminare sia gli studi filogenetici che l'analisi delle sequenze genomiche dei ceppi appartenenti alla linea genetica 1 (ceppi WNV Europei, Africani, Americani e del Medio-Oriente).

Come già accennato, sono stati considerati i virus WN della linea genetica 1 perché sono stati tutti isolati nel corso di epidemie sia umane che animali in cui le caratteristiche fondamentali sono state l'encefalite ed una elevata mortalità. In particolare, negli animali, tali virus sono stati isolati specialmente negli equini e negli uccelli. A questo proposito è stato considerato un lavoro in cui è stata analizzata la sequenza del genoma di diversi ceppi Europei, Americani e del Medio-Oriente (Lanciotti et al., 2002). Le omologie di sequenza dei ceppi WNV appartenenti alla linea genetica 1 e 2 possono essere così riassunte:

- i ceppi Americani, come MD 2000-crow 256, NY 1999-equine, NY 2000-MQ 5488, NY 2000-grouse 3282, NY 2000-crow 3356 e NY 1999-flamingo che fanno parte del primo cluster della linea genetica 1, mostrano tra di loro una identità nucleotidica maggiore del 99,8% e sembrano derivati dal ceppo Israel 1998-A con cui mantengono una omologia di sequenza del 99,7%;
- i ceppi Europei, come Romania 1996-MQ ed Italy 1998-equine, appartenenti al primo cluster della linea genetica 1 e caratterizzati da una omologia di sequenza nucleotidica superiore al 99,7% con i ceppi Americani e con il ceppo Israel 1998-A;
- i ceppi Kunjin, come Kunjin 1960 e Kunjin 1994, appartenenti al secondo cluster della linea genetica 1 presentano una omologia di sequenza nucleotidica di circa l'87% con i virus WN Europei, Americani ed con il ceppo Africano Egypt 1951 od Egypt 101; mentre mostrano una identità di sequenza del 75,7% con il ceppo Uganda 1937;
- il ceppo Uganda 1937, appartenente alla linea genetica 2, mostra una identità di sequenza del 76% con tutti gli altri ceppi WNV raggruppati nella linea genetica 1 (ceppi Americani, Europei, del Medio-Oriente ed i Kunjin virus isolati in Australia).

Questo studio filogenetico appena descritto e condotto da Lanciotti e collaboratori è stato effettuato prendendo in esame specifiche regioni del genoma di WNV che sono: il gene E codificante per la glicoproteina E, il gene del capsido C, il gene NS5 e la regione

3' non codificante (NC). Gli autori, inoltre, hanno evidenziato la percentuale di identità di sequenza nucleotidica per tutti i geni costituenti il genoma di WNV appartenenti alla linea genetica 1. Tale percentuale di identità di sequenza può essere così schematizzata:

- gene C (capside)→ 90,2%;
- gene PrM (premembrana)→95,7%;
- gene M (membrana)→96,0%;
- gene ENV (envelope)→95,4% ;
- gene NS1 (proteina non-strutturale NS1)→92,9%;
- gene NS2a (proteina non-strutturale NS2a)→90,0%;
- gene NS2b (proteina non-strutturale NS2b)→99,2%;
- gene NS3 (proteina non-strutturale NS3)→95,3%
- gene NS4b (proteina non-strutturale NS4b)→91,8%;
- gene NS5 (proteina non-strutturale NS5)→95,6%;
- gene NC (regione 3' non codificante)→99,8%

Tenendo conto di questi dati abbiamo ritenuto che uno dei target migliori per la diagnosi molecolare di WNV è il gene NC. È stato così preso come riferimento un articolo (Lanciotti et al., 2000) in cui è descritta una sensibile e specifica Real-Time in grado di rilevare la regione 3' non codificante del genoma (NC) nel ceppo NY99 di WNV. Va ricordato che il ceppo NY99 è stato isolato dall'insetto vettore (Culex), nel siero e nelle biopsie di tessuto cerebrale sia di animali (in particolare il cavallo) che di persone decedute nel corso degli episodi epidemici del 1999 che si sono avuti nel New Jersey ed a New York (Anderson et al., 1999; Lanciotti et al., 1999).

In questo lavoro la metodica di Real-Time PCR per WNV è stata messa a punto da Lanciotti e collaboratori su svariati tipi di matrici biologiche:

- siero umano e tessuto cerebrale prelevato nel corso dell'autopsia da pazienti umani deceduti in seguito ad infezione da WNV accertata sierologicamente mediante ELISA ed il test di neutralizzazione dell'effetto citopatico (PRNT);
- tessuti e tamponi aviari (in particolare tampone faringeo)
- insetto vettore.

Il limite di rilevabilità del saggio in Real-Time è stata studiato ampiamente dagli autori. Un primo metodo per valutare la rilevabilità ha richiesto l'allestimento di diluizioni seriali in base 10 del ceppo NY99 precedentemente titolato (dalla diluizione $10^{-1}=1,000$ PFU alla diluizione $10^{-6}=0,01$ PFU). In questo caso il limite di sensibilità corrisponde ad 0,01 PFU.

Un secondo metodo per lo studio della rilevabilità ha utilizzato pools dell'insetto vettore (Culex) raccolti a New York e nel New Jersey durante l'epidemia del 1999. Ogni pool è stato diluito, mediante diluizioni seriali in base 10, ed ogni singola diluizione è stata titolata (dalla diluizione 10^{-1} = placche talmente elevate da essere impossibile quantificarle alla diluizione 10^{-6} = 10 placche di lisi). Il limite di sensibilità rilevato corrisponde alla diluizione 10^{-8} che equivale ad 1 PFU.

La specificità del saggio in Real-Time è stata valutata considerando:

- sei ceppi isolati in Europa ed Africa e classificati come WNV→ceppo Egypt 1951, Italy 1998, Romania 1996-H, Kenya 1998 e Kunjin 1960. Il saggio in Real-Time ha dato esito positivo con valori di Ct compresi tra 20,58 e 29,02.
- sei ceppi sierologicamente ritenuti appartenere ai Flavivirus → Japanese Encephalitis Virus, Murray Valley Encephalitis Virus, St. Louis Encephalitis Virus, Dengue Virus type 2, Yellow Fever Virus ed Powassan Virus. Il saggio in Real-Time ha dato esito negativo.
- tre virus trasmessi da insetti ematofagi (arthropod-borne virus) che circolano nel Nord America → Eastern Equine Encephalitis Virus, Western Equine Encephalitis Virus ed La Crosse Virus. Il saggio in Real-Time ha dato esito negativo.

E' interessante sottolineare che, nel lavoro esaminato, i primers e la sonda selezionati sono stati anche testati per la diagnosi di WNV in campioni di liquido cerebrospinale e di siero umani. In effetti 16 campioni di liquido cerebrospinale, su di un totale di 28 campioni, hanno dato un risultato positivo in Real-Time. Soltanto 4 campioni di siero, su di un totale di 28 campioni sierologicamente confermati (IgM ELISA ed PRNT) come WNV positivi, sono risultati positivi. La ridotta capacità di rilevare il virus è probabilmente dovuta alla breve durata della viremia sia nel liquido cerebrospinale che nel siero umano.

SELEZIONE DEI PRIMERS IDONEI PER WEST NILE VIRUS PER L'IMPIEGO IN PCR-REAL TIME

Il protocollo sopra riportato ed elaborato da questo stesso lavoro scientifico (Lanciotti et al., 2000) è stato considerato valido per il nostro scopo e quindi i primers e le sonda sono stati da noi ordinati.

Per il disegno dei primers e della sonda, Lanciotti e collaboratori hanno fatto riferimento alla sequenza completa del genoma del ceppo NY99 di WNV che è stata ampiamente studiata dagli stessi autori ed è stata registrata in GenBank con accession number AF196835 (Lanciotti et al., 1999).

Utilizzando tale sequenza ed in particolare quella relativa alla porzione 3' del genoma non codificante (NC), i primers e la sonda specifici per la tecnologia TaqMan sono stati disegnati impiegando il programma Primer Express version 2.0 (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Le sonde TaqMan sono state marcate con FAM (5-carbossifluoresceina) come 5' reporter fluorescente e con TAMRA (6-carbossitetrametilrodamina) come 3' quencher.

Le sequenze dei primers e della sonda sono di seguito riportate:

- WN3'NC forward che si estende dal 668°esimo al 684°esimo nucleotide del genoma di NY99 ed è localizzato all'interno di prM gene.
5'-CAGACCACGCTACGGCG-3'
- WN3'NC reverse che si estende dal 756°esimo al 770°esimo nucleotide del genoma di NY99 ed è localizzato all'interno di prM gene.
5'-CTAGGGCCGCGTGGG-3'

- WN3'NC probe che si estende dal 691°esimo al 714°esimo nucleotide del genoma di NY99 ed è localizzato all'interno di prM gene.
5'-FAM-TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT-TAMRA-3'

Il prodotto dell'amplificazione è di 103bp.

La valutazione della specificità dei primers e della sonda è stata effettuata dal nostro laboratorio mediante una ricerca in BLAST in cui è stata valutata l'omologia di sequenza mediante la voce Nucleotide-Nucleotide Blast (blastn) impiegando come query la stessa sequenza dei primers e delle sonde e dando un limite, per quanto riguarda il numero di genomi virali da consultare in GeneBank, di 600 sequenze. Il risultato di tale ricerca in BLAST ha mostrato una omologia di sequenza del 100% sia dei primers che della sonda per il ceppo NY99 ed una omologia superiore al 95% con i ceppi finora isolati e sequenziali di WNV.

Inoltre, la ricerca in BLAST ha evidenziato una assoluta specificità per la porzione NC del genoma di WNV; infatti non si ha alcuna omologia di sequenza con gli altri membri del Japanese Encephalitis Serocomplex che comprende i seguenti Flavivirus: *Japanese Encephalitis Virus*, *St.Louis Encephalitis*, *West Nile Virus*, *Murray Valley Encephalitis Virus*, *Kunjin Virus*, *Alfuy Virus*, *Koutango Virus*, *Usutu Virus*, *Kokobera Virus* ed *Stratford Virus*.

Come metodo alternativo sono state selezionate ulteriori regioni conservate nel genoma di WNV tenendo anche conto delle percentuali di identità di sequenza sopra riportate tra i virus appartenenti alla linea genetica 1.

Per la ricerca di tali regioni sono stati effettuati due multiallineamenti.

Un primo multiallineamento tra i seguenti genomi dei ceppi Americani, Europei ed Africani isolati negli animali e nell'uomo appartenenti al primo cluster della linea genetica 1: NY99 (accession number AF202541), NY99-eq (accession number AF260967), Italy-98 (accession number AF404757), Romania-1996 (accession number AF260969) ed Egypt 101 (accession number AF260968).

Un secondo multiallineamento inserendo, oltre ai ceppi sopra riportati, anche il ceppo Kunjin (accession number D00246) che appartiene al secondo cluster della linea genetica 1.

Dall'analisi dei multiallineamenti è stato constatato che alcune porzioni del gene NS2a sono conservate, sebbene questo stesso gene, non è tra i più conservati. Molti dati sperimentali, inoltre, dimostrano che la proteina non strutturale NS2a è fondamentale per l'assemblaggio dei virus. In effetti, esperimenti di mutagenesi mirata producono mutanti (sostituzione della Ile 59 ad Asn) incapaci di guidare lo stesso assemblaggio dei vari componenti virali strutturali e non strutturali (Liu et al., 2003).

La sequenza consensus relativa al multiallineamento del gene NS2a per i ceppi WNV Americani, Europei, Africani più il Kunjin virus è stata analizzata mediante il programma Primer Express® Version 3.0 della Applied Biosystem.

Il programma ha evidenziato una regione bersaglio a cavallo tra le porzioni codificanti per NS1 ed NS2a in cui la sonda ed i primers possono essere disegnati rispettando le

condizioni riportate dallo stesso programma. Inoltre sia la sonda che il primer reverse individuati sono perfettamente conservati in tutti i ceppi utilizzati per il multiallineamento. Invece per il primer forward la sequenza non è conservata in tutti i ceppi analizzati. In effetti, in posizione 3528 della sequenza consensus per i ceppi Italy-1998, Romania-1996, Egypt-101 e Kunjin virus c'è una C; mentre per i ceppi NY99 ed NY99-eq c'è una T. In posizione 3521 per i ceppi NY99, NY99-eq, Italy-1998 e Romania-1996 c'è una T; mentre per i ceppi Kunjin virus ed Egypt-101 C'è una C. Tenendo presenti queste sostituzioni sono stati considerati due tipi di primers forward che si estendono nello stesso tratto del gene NS2a soltanto che uno dei due è stato disegnato degenerato nelle posizioni variabili.

Le sequenze dei primers e delle sonde sono le seguenti:

- WND forward NS2AD (degenerato) che è compreso tra il 3516°esimo ed il 3541°esimo nucleotide
5'-AGTGAATGCTTAYAAAYGCTGATATGA-3'
- WND forward NS2A che ha la stessa identica collocazione:
5'-AGTGAATGCTTACAATGCTGATATGA-3'
- WND reverse NS2A che è compreso tra il 3621°esimo ed il 3600°esimo nucleotide:
5'-GATCTTGGCTGTCCACCTCTTG-3'
- WND probe NS2A che si estende dal 3561°esimo al 3585°esimo nucleotide:
5'-FAM-CCTTCTGGTCGTGTTCTTGGCCACC-TAMRA-3'

La sonda TaqMan è stata marcata con FAM (5-carbossifluoresceina) come 5' reporter fluorescente e con TAMRA (6-carbossitetrametilrodamina) come 3' quencher. Il prodotto di amplificazione è di 105 bp.

La valutazione della specificità di questi stessi primers e della sonda è stata effettuata mediante la voce Nucleotide-Nucleotide BLAST (blastn) impiegando come query la stessa sequenza dei primers e della sonda e dando un limite, per quanto riguarda il numero dei genomi virali da consultare in GenBank, di 1000 sequenze. Il risultato di tale ricerca in BLAST, considerando sia la sequenza del primer reverse che della sonda, ha mostrato una omologia di sequenza del 100% soltanto con i ceppi WNV Europei, Africani, Americani e Kunjin virus tra cui vi sono compresi anche quei stessi ceppi impiegati per effettuare l'analisi del multiallineamento. Mentre per il primer forward vi è una omologia di sequenza del 100% con i ceppi WNV Europei, Africani, Americani compreso il Kunjin virus; in più si osserva una minore omologia di sequenza compresa tra il 50% e l'80% con altri virus che fanno parte dei *Flavivirus* (*Murray Valley Encephalitis virus*, *Japanese Encephalitis virus* ed *Usutu virus*).

Anche questi ultimi primers e sonda sono stati ordinati e verranno impiegati per la messa a punto di un adeguato protocollo di Real-Time PCR.

Il risultato di tale ricerca in BLAST ha mostrato una omologia di sequenza del 100% sia con i ceppi WNV Europei, Africani, Americani compreso il Kunjin virus che con il ceppo WNV B956, considerato il ceppo prototipo della seconda linea genetica.

L'elevata omologia riportata per la porzione NS2a compresa tra il 3516°esimo ed il 3600°esimo nucleotide nell'ambito dei ceppi WNV appartenenti sia alla 1 che alla 2

linea genetica può essere spiegata con il fatto che la stessa proteina non strutturale NS2a è fondamentale per l'assemblaggio dei virus.

In effetti, esperimenti di mutagenesi mirata producono mutanti (sostituzione della Ile 59 ad Asn) incapaci di guidare lo stesso assemblaggio dei vari componenti virali strutturali e non strutturali (Liu W.J. et al.; J.Virol.(2003); 77 (14):7804-7813).

Inoltre, la regione target dei primers e della sonda da noi selezionata, da un punto di vista biologico, deve essere altamente conservata nei ceppi WNV della 1 e della 2 linea genetica perché contiene una sequenza segnale riconosciuta da una specifica proteasi della cellula ospite, presente nel reticolo endoplasmatico, che la taglia determinando così la maturazione delle proteine virali NS1 ed NS2a (Falgout B et al.; J.Virol.(1995); 69 (11):7232-7243).

Tra l'altro, i recenti dati sperimentali hanno dimostrato che la proteina NS2a è fondamentale nel coordinare il passaggio dalla replicazione dell'RNA virale all'impacchettamento dello stesso RNA virale all'interno del nucleocapside (Khromykh A.A. et al.; J.Virol.(2001); 75(10): 4633-4640).

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI REAL TIME RT-PCR PER LA DIAGNOSI DI WNV

OTTIMIZZAZIONE DEL SAGGIO DI REAL TIME RT-PCR

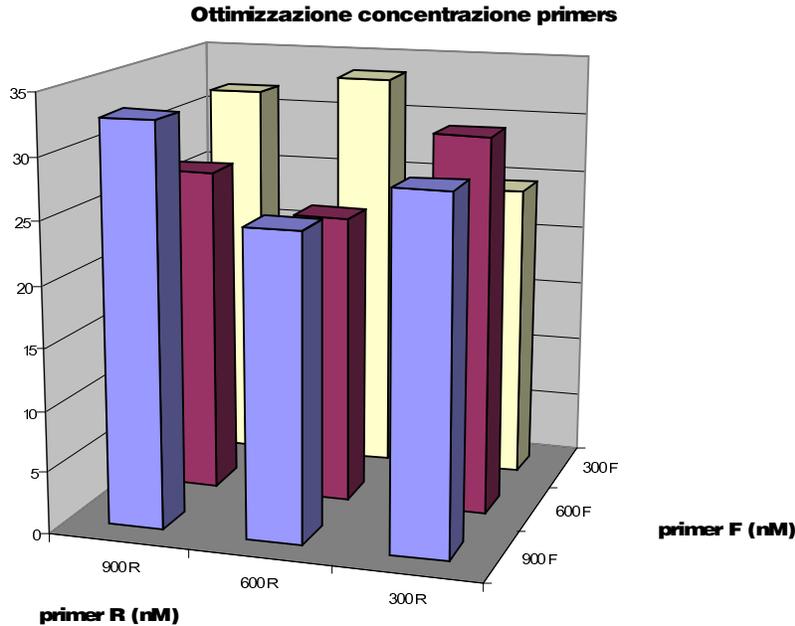
L'ottimizzazione del saggio ha richiesto l'utilizzo di una serie di combinazioni di diverse concentrazioni di primers, per quanto riguarda il primer WND forward NS2a ed il primer WND reverse NS2a, che sono riportate nella tabella n.6.

Tabella n. 6: Combinazioni delle concentrazioni dei primers WND forward NS2a e del primer WND reverse NS2a

<i>Primer forward</i>	<i>Primer reverse</i>
900nM	900nM
600nM	600nM
300nM	300nM
900nM	600nM
900nM	300nM
600nM	900nM
600nM	300nM
300nM	900nM
300nM	600nM

Ogni combinazione delle concentrazioni di primers è stata analizzata in triplicato impiegando come stampo sia l'RNA totale estratto dalle cellule BHK21 infette con il ceppo Egypt 101 che diluizioni in base 10 dell'RNA relativo alla regione amplificata NS2a trascritta in vitro.

Figura 5: Ottimizzazione delle concentrazioni dei primers, impiegando il primer forward non degenerato(WND forward NS2a) ed il primer WND reverse NS2a



Il migliore Ct (Ct=23,55) è relativo alla concentrazione di 600 nM per entrambi i primers ed è stato ottenuto sia con l'RNA totale estratto dalle cellule BHK21 infette con il ceppo Egypt 101 che con la diluizione 10^5 (□ 50 molecole) dell'RNA relativo alla regione NS2a trascitta in vitro.

L'ottimizzazione del saggio è stata effettuata anche impiegando come primer forward quello degenerato(WND forward NS2aD) e come reverse lo stesso primer sopra riportato (primer WND reverse NS2a), impiegando però diverse combinazioni di primers riportate nella tabella n.7.

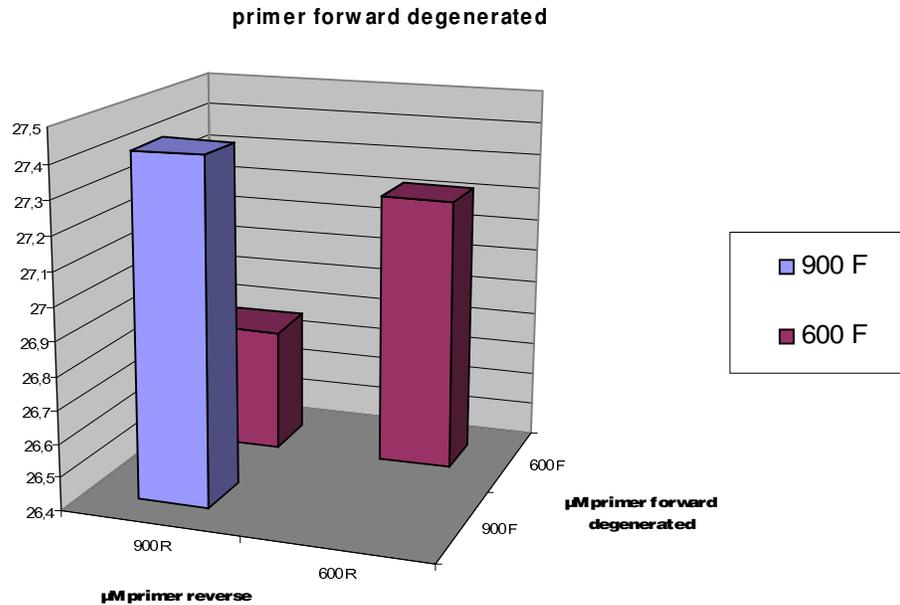
Tabella n. 7: Combinazioni delle concentrazioni del primers WND forward NS2aD e del primer WND reverse NS2a

<i>Primer forward degenerato</i>	<i>Primer reverse</i>
900 nM	900 nM
600 nM	600 nM
600 nM	900 nM

Anche in questo caso, ogni combinazione delle concentrazioni di primers è stata analizzata in triplicato impiegando come stampo sia l'RNA totale estratto dalle cellule

BHK21 infette con il ceppo Egypt 101 che diluizioni in base 10 dell'RNA relativo alla regione amplificata NS2a trascritta in vitro.

Figura 6: Ottimizzazione delle concentrazioni dei primers, impiegando il primer forward degenerato(WND forward NS2aD) ed il primer WND reverse NS2a



Il migliore Ct (Ct=26,77) è relativo alla concentrazione di 600 nM per il primer forward e di 900 nM per il primer reverse ed è stato ottenuto sia con l'RNA totale estratto dalle cellule BHK21 infette con il ceppo Egypt 101 che con la diluizione 10^5 (□ 50 molecole) dell'RNA relativo alla regione NS2a trascritta in vitro.

Per entrambe le coppie dei primers analizzate, la concentrazione ottimale della probe è risultata essere 200 nM.

Inoltre queste stesse concentrazioni dei primers e della probe sono state confermate come valide anche quando si è utilizzato come stampo i cDNA ottenuti sia dall'RNA totale estratto dalle cellule BHK21 infette con il ceppo Egypt 101 che dalle diluizioni in base 10 dell'RNA relativo alla regione NS2a trascritta in vitro.

Saggio Real Time RT-PCR partendo da stampo ad RNA

E' stato utilizzato il kit one step RT PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems) e la composizione della master mix relativa al primer WND forward NS2a non degenerato ed al primer WND reverse NS2a è riportata in tabella n.8.

Tabella n. 8: Composizione Master Mix per 1 campione impiegando il primer forward non degenerato(WND forward NS2a)

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μ l	Concentrazione finale
TaqMan [®] 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 μ l	1X
Primer WND forward NS2a \times 30 μ l \times	0,5 μ l	600 nM
Primer WND reverse NS2a \times 30 μ l \times	0,5 μ l	600 nM
Probe WND NS2a \times 10 μ l \times	0,5 μ l	200 nM
40 X Multi Scribe \times and RNase Inhibitor Mix \times 50 U/ μ l \times	0,65 μ l	\times 5U/ μ l \times
H ₂ O-DEPC	5,35 μ l	
Stampo	5 μ l	
Volume finale	25 μ l	

Per quanto riguarda la composizione della master mix relativa al primer WND forward NS2aD degenerato ed al primer WND reverse NS2a è riportata in tabella n.9.

Tabella n. 9: Composizione Master Mix per 1 campione impiegando il primer forward degenerato (WND forward NS2aD)

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μ l	Concentrazione finale
TaqMan [®] 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)	12,5 μ l	1X
Primer WND forward NS2aD \times 30 μ l \times	0,5 μ l	600 nM
Primer WND reverse NS2a \times 30 μ l \times	0,75 μ l	900 nM
Probe WND NS2a \times 10 μ l \times	0,5 μ l	200 nM
40 X Multi Scribe \times and RNase Inhibitor Mix \times 50 U/ μ l \times	0,65 μ l	\times 5U/ μ l \times
H ₂ O-DEPC	5,1 μ l	
Stampo	5 μ l	
Volume finale	25 μ l	

L'amplificazione è stata effettuata impiegando lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) e consiste in 30' a 48°C (reazione di retrotrascrizione), 10' a 95°C (attivazione della DNA polimerasi), seguita da 50 cicli composti da 95°C per 15'' e 60°C per 1'.

Saggio Real Time RT-PCR partendo da stampo a cDNA

E' stato utilizzato il kit High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) che permette la sintesi del cDNA partendo dall'RNA ed utilizzando una miscela di brevi oligonucleotidi come primer (Random primers).

La composizione della master mix per la sintesi del cDNA è riportata nella tabella n. 10.

Tabella n. 10: Composizione Master Mix, relativa ad 1 campione, per la sintesi del cDNA

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μ l	Concentrazione finale
H ₂ O-DEPC	12,6 μ l	
Buffer 10X	6 μ l	1X
dNTP 25X	2,4 μ l	1,5 mM
Random primers 10X	6 μ l	1X
Reverse trascrittase 50 U/ μ l	3 μ l	1 U/ μ l
Stampo	30 μ l	

L'amplificazione è stata effettuata impiegando lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) e consiste in 10' a 25°C e 45' a 37°C.

Una volta sintetizzato il cDNA, è stata effettuata la Real Time RT- PCR impiegando il primer forward sia degenerato che non degenerato.

Per entrambe le master mix è stato impiegato il kit Taq Man[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

La composizione della master mix relativa al primer WND forward NS2a non degenerato ed al primer WND reverse NS2a è riportata in tabella n.11.

Tabella 11: Composizione Master Mix per 1 campione impiegando il primer forward non degenerato(WND forward NS2a) e come stampo il cDNA

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μ l	Concentrazione finale
Buffer 2X Master Mix	12,5 μ l	1X
Primer WND forward NS2a 30 μ l	0,5 μ l	0,6 μ M
Primer WND reverse NS2a 30 μ l	0,5 μ l	0,6 μ M
Probe WND NS2a 10 μ l	0,5 μ l	0,2 μ M
H ₂ O-DEPC	6 μ l	
Stampo(cDNA)	5 μ l	

Per quanto riguarda la composizione della master mix relativa al primer WND forward NS2aD degenerato ed al primer WND reverse NS2a è riportata in tabella n.12.

Tabella n. 12: Composizione Master Mix per 1 campione impiegando il primer forward degenerato(WND forward NS2aD) e come stampo il cDNA

Reagente (da aggiungere nell'ordine)	Volume per 1 campione in μ l	Concentrazione finale
Buffer 2X Master Mix	12,5 μ l	1X
Primer WND forward NS2aD 30 μ l	0,5 μ l	0,6 μ M
Primer WND reverse NS2a 30 μ l	0,75 μ l	0,9 μ M
Probe WND NS2a 10 μ l	0,5 μ l	0,2 μ M
H ₂ O-DEPC	6 μ l	
Stampo(cDNA)	5 μ l	

L'amplificazione è stata effettuata impiegando lo strumento ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems) e consiste in 2'a 50°C (attivazione della DNA polimerasi), seguita da 50 cicli composti da 95°C per 15'' e 60°C per 1'.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' ASSOLUTA DELLA WNV REAL TIME RT PCR

La valutazione della sensibilità assoluta della Real Time RT-PCR ha comportato la sintesi in vitro dell'mRNA relativo alla regione amplificata NS2a

Produzione dell'mRNA relativo alla regione amplificata NS2a (mRNA NS2a)

La sintesi dell'mRNA NS2a ha comportato diversi passaggi:

- amplificazione mediante RT-PCR (One Step RT-PCR kit Qiagen) del frammento di 105 bp relativo alla regione amplificata NS2a, compresa fra i primers selezionati;
- clonaggio della regione amplificata NS2a(105 bp) all'interno del plasmide pCRII-TOPO(TOPO TA Cloning[®] kit Dual Promoter, Invitrogen);trasformazione delle cellule competenti batteriche One SHOT TOP 10;
- selezione delle colonie ottenute dalla trasformazione su terreno Luria Bertani addizionato con Ampicillina ed X-gal;
- estrazione del plasmide e controllo dell'inserito clonato(NS2a) mediante sia PCR con i primers specifici per la regione NS2a e con i primers M13 che con digestione effettuata con gli enzimi di restrizione EcoRV(Roche)(un'unica banda di 4.105 bp),EcoRI(Roche)(due bande: 128 bp e 3.977 bp), NcoI(Roche) (un'unica banda di 4.105 bp) e NotI(un'unica banda di 4.105 bp);
- linearizzazione del plasmide pCRII-TOPO in cui è stato clonata la regione NS2a mediante taglio enzimatico con NcoI(Roche);

- reazione di trascrizione dell'mRNA relativo alla regione NS2a clonata sfruttando il promotore SP6(Mega script[®]T7/Sp6 kit, Ambion);
- eliminazione del DNA plasmidico mediante trattamento dell'mRNA relativo ad NS2a sintetizzato con 2U di DNase I(Turbo DNA-free Kit, Ambion);
- purificazione dell'mRNA relativo ad NS2a sintetizzato con le Centri-Sep colonne(Princeton Separations, INC);
- quantizzazione mediante lettura allo spettrofotometro;
- calcolo del numero delle molecole di mRNA relativo ad NS2a/μl applicando la seguente formula: X grammi/μl di RNA sintetizzato/μlunghezza dell'RNA trascritto in nucleotidi x 340 ÷ X 6.022 x 10²³

Il numero delle molecole di mRNA relativo ad NS2a sintetizzato è pari a 1,05 x 10¹⁰ molecole/μl.

Allestimento di una serie di diluizioni per l'mRNA relativo alla regione NS2a clonata e studio della Curva Standard della Real Time RT-PCR

Una volta stabilito il numero di molecole dell'mRNA relativo alla regione NS2a clonata, per restringere l'intervallo di molecole di mRNA-NS2a in cui va ricercato il LOD è stata effettuata una prima serie di diluizioni in modo tale che ciascuna diluizione corrisponda ad un determinato numero di molecole di mRNA-NS2a.

Tabella n.13: Diluizioni e corrispondenti molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro

Diluizione	N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro
10 ¹	1,8 x 10 ⁶
10 ²	6 X 10 ⁴
10 ³	2 X 10 ³
10 ⁴	65
10 ⁵	2,2
10 ⁶	0,07

Ciascuna diluizione è stata testata in quadruplicato impiegando il kit one step RT PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems). Per la diluizione 10⁴ è stato constatato che su quattro replicati soltanto tre hanno dato un esito positivo, mentre per la diluizione 10⁵ su quattro replicati due hanno dato esito positivo.

Tabella n.14: valori dei Ct medi riscontrati per la prima serie di diluizioni dell'mRNA-NS2a

N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro	Ct medio	1°Ct	2°Ct	3°Ct	4°Ct
1,8 x 10 ⁶	23,76	22,55	24,08	24,23	24,19
6 X 10 ⁴	29,15	28,75	29,07	29,38	29,41
2 X 10 ³	36,73	37,35	35,09	36,59	37,92
65	39,08	38,03	38,45	40,65	39,20
2,2	41,39	NEG	40,73	44,63	38,81
0,07	38,15	NEG	37,57	NEG	38,73

Questi dati ottenuti hanno permesso di valutare l'intervallo in cui deve essere ricercato in maniera più dettagliata il LOD, infatti va ricercato nell'intervallo compreso tra 2 X 10³ molecole di mRNA-NS2a e 0,07 molecole di mRNA-NS2a.

A tale scopo è stata effettuata una seconda serie di diluizioni in modo tale che ciascuna diluizione corrisponda ad un determinato numero di molecole di mRNA-NS2a.

Tabella n.15: Diluizioni e corrispondenti molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro

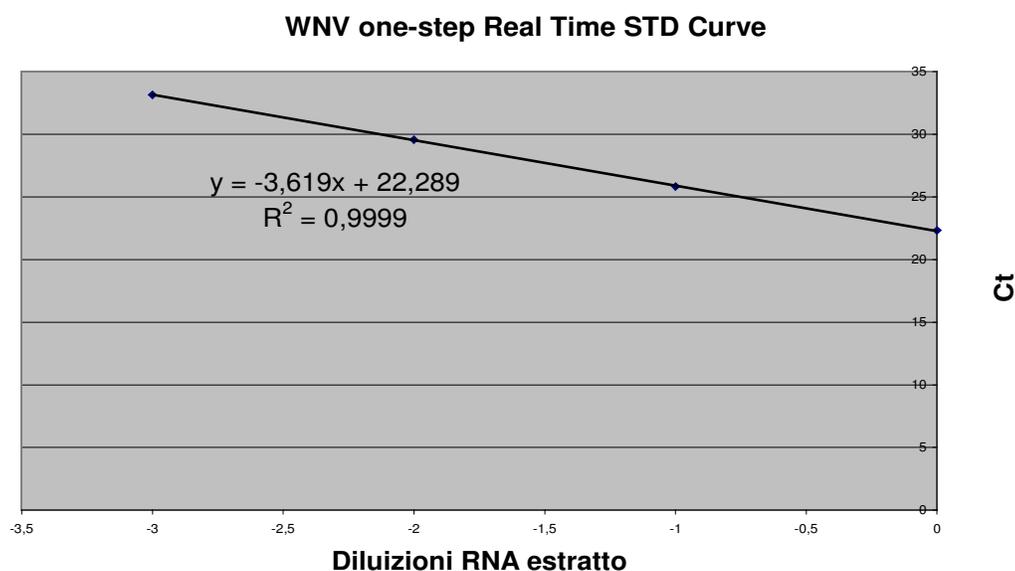
Diluizione	N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro
10 ¹	2 x 10 ⁶
10 ²	2 X 10 ⁵
10 ³	2 X 10 ⁴
10 ⁴	2 X 10 ³
10 ⁵	2 X 10 ²
10 ⁶	20
10 ⁷	2
10 ⁸	0,2

Ciascuna diluizione è stata testata in dieci repliche impiegando il kit one step RT PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems). Per la diluizione 10⁷ è stato constatato che su dieci replicati soltanto quattro hanno dato un esito positivo, mentre per la diluizione 10⁸ su dieci replicati solamente tre hanno dato esito positivo.

Tabella n.16: valori dei Ct medi riscontrati per la seconda serie di diluizioni dell'mRNA-NS2a.

Diluizione	N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro	Ct medio
10 ¹	2 x 10 ⁶	20,76
10 ²	2 X 10 ⁵	23,85
10 ³	2 X 10 ⁴	26,15
10 ⁴	2 X 10 ³	29,98
10 ⁵	2 X 10 ²	31,87
10 ⁶	20	34,18
10 ⁷	2	37,95
10 ⁸	0,2	49,47

Nella figura 7 è riportato il grafico relativo alla curva standard ottenuta impiegando i valori medi dei Ct delle dieci repliche di ciascun campione di RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette.



Dalla figura 7 si evince 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 ottimale funzionamento dei primers selezionati. L'efficienza del nostro test è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, dove lo slope è pari a $-3,619$, ed è risultata essere del 90%. Inoltre è stato appurato, in una serie di tre esperimenti indipendenti tra loro, che la linearità del saggio di Real Time RT-PCR è compresa tra 10⁶ molecole (con Ct compreso tra 20 e 23) e circa 200-120 molecole (con Ct compreso tra 33 e 34) di mRNA-NS2a.

Allestimento di una serie di diluizioni per l'mRNA relativo alla regione NS2a clonata e studio della Curva Standard della Real Time PCR partendo da stampo a cDNA

Una volta stabilito il numero di molecole dell'mRNA relativo alla regione NS2a clonata, per restringere l'intervallo di molecole di mRNA-NS2a in cui va ricercato il LOD è stata effettuata una prima serie di diluizioni in modo tale che ciascuna diluizione corrisponda ad un determinato numero di molecole di mRNA-NS2a.

Tabella n.17: Diluizioni e corrispondenti molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro

Diluizione	N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro
10 ¹	1,1 x 10 ⁷
10 ²	3,6 X 10 ⁵
10 ³	1,2 X 10 ⁴
10 ⁴	390
10 ⁵	12,9
10 ⁶	0,42

Ciascuna diluizione è stata testata in quadruplicato effettuando prima la sintesi del cDNA, utilizzando il kit High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems) e poi la Real Time con il kit Taq Man[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Per tutte le diluizioni è stata osservata la presenza dell'amplificato in ogni replicato.

Tabella n.18: Valori dei Ct medi riscontrati per la prima serie di diluizioni dell'mRNA-NS2a utilizzato per la sintesi del cDNA.

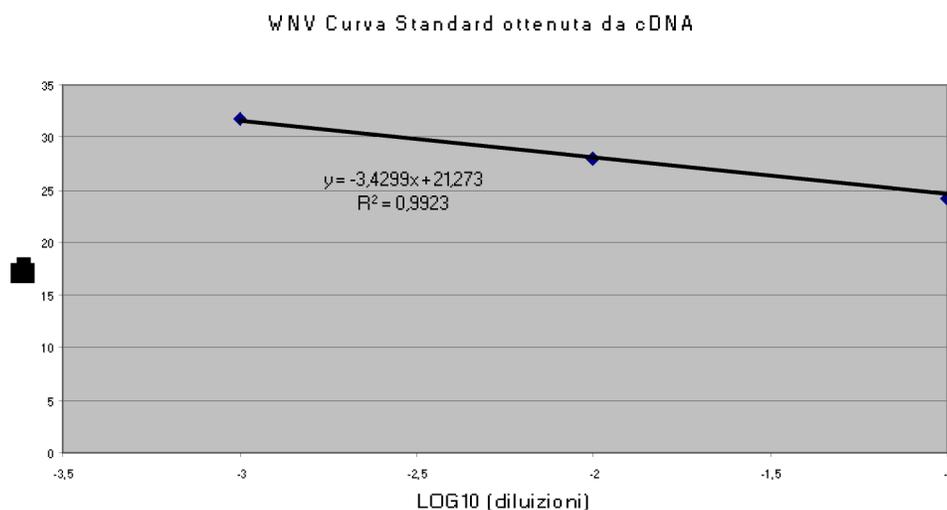
N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro	Ct medio	1°Ct	2°Ct	3°Ct	4°Ct
1,1 x 10 ⁷	15,83	16,00	15,58	15,99	15,78
3,6 x 10 ⁶	18,88	18,78	18,99	18,70	19,05
1,2 x 10 ⁴	24,44	24,99	24,00	24,22	24,56
390	28,31	28,70	28,56	28,02	27,99
12,9	31,91	31,79	32,00	31,99	31,89
0,42	35,93	35,90	36,00	35,90	35,95

Questi dati ottenuti hanno permesso di valutare un aumento della sensibilità della metodica. Di conseguenza sono state allestite una seconda serie di diluizioni in modo tale da verificare il LOD che va ricercato nell'intervallo compreso tra 200 molecole di mRNA-NS2a e 0,2 molecole di mRNA-NS2a.

Tabella n.19: Valori dei Ct medi riscontrati per la seconda serie di diluizioni dell'mRNA-NS2a.

Diluizione	N° di molecole di mRNA-NS2a sintetizzato in vitro	Ct medio
10 ¹	2 x 10 ⁵	21,85
10 ²	2 X 10 ⁴	24,56
10 ³	2 X 10 ³	27,37
10 ⁴	2 X 10 ²	30,95
10 ⁵	20	32,98
10 ⁶	2	35,99
10 ⁷	0,2	39,78

Nella figura 8 è riportato il grafico relativo alla curva standard ottenuta impiegando i valori medi dei Ct delle dieci repliche di ciascun campione di cDNA ottenuto dall' RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette.



Dalla figura 8 si evince 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 ottimale funzionamento dei primers selezionati. L'efficienza del nostro test è stata calcolata secondo la formula $E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$, dove lo slope è pari a $-3,4299$, ed è risultata essere del 97,11%. Inoltre è stato appurato che la linearità del saggio di Real Time RT-PCR è compresa tra 10⁷ molecole (con Ct compreso tra 20 e 21) e circa 50-20 molecole (con Ct compreso tra 32 e 35) di mRNA-NS2a.

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITA' RELATIVA E DELLA SPECIFICITA' DELLA WNV REAL TIME RT-PCR NEI CONFRONTI DI CEPPI DI DIVERSA ORIGINE

Sensibilità relativa della WNV Real Time RT-PCR rispetto ad un metodo di confronto

Per la sensibilità relativa sono state effettuate diluizioni seriali in base 10 dell'RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette. Ciascuna diluizione è stata analizzata sia con i primer e sonda relativi ad NS2a che con i primer e sonda relativi alla regione NC(compresa tra il 10.668° nucleotide ed il 10.770° nucleotide).

Tabella n. 20: Media dei Ct relativi alle tre repliche per ciascuna diluizione dell'RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette.

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

I risultati sono paragonabili per tutti e due i target molecolari.

Specificità relativa della WNV Real Time RT-PCR nei confronti di diversi agenti eziologici

Per lo studio della specificità relativa sono stati considerati sia i primer e sonda relativi ad NS2a che i primer e sonda relativi alla regione NC(compresa tra il 10.668° nucleotide ed il 10.770° nucleotide). Inoltre, la specificità del saggio è stata testata sul genoma estratto dai seguenti ceppi: a) WNV Lineage 1 stipiti NY99-snowy owl(ATCC), NY99 equine, NY99crow, 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 EHV-1, entrambi responsabili di encefalomieliti negli equini.

Tabella n. 21: Media dei Ct relativi alle due repliche per ciascuna diluizione dell'RNA totale estratto dalle cellule BHK₂₁ infette.

Virus	primers NS2a	primers NC
WNV B956(ATCC)	28,66	negativo
WNV NY99-snowy owl (ATCC)	20,16	16,29
WNV Arb310/67	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
BDV	negativo	negativo
EHV-1	negativo	negativo

Come si può osservare, i primers NS2a sono altamente specifici perchè non danno alcun amplificato sia nel caso dei virus caratterizzati dallo stesso tropismo, ossia BDV ed EHV-1, che nel caso di Usutu virus, un Flavivirus strettamente correlato a WNV. Inoltre, 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.

CAMPIONI SU CUI E' STATA TESTATA LA WNV REAL TIME RT-PCR

La WNV Real Time RT-PCR è stata testata su diverse tipologie di campioni provenienti da animali risultati positivi ai test sierologici e qui di seguito indicati: a) midollo toracico di cavallo; b) midollo cervicale di cavallo; c) pool di visceri di ghiandaia; d) pool di visceri di pollo. La WNV Real Time RT-PCR ha dato esiti positivi ed i valori dei Ct medi sono riportati nella tabella n.22.

Tabella n.22: Campioni lavorati e Ct medi registrati.

Campioni	Ct medi
Midollo toracico di cavallo	25,29
Midollo cervicale di cavallo	21,89
Pool di visceri di ghiandaia	24,76
Pool di visceri di gazza	26,89

Tutti gli animali provengono dall'ultimo focolaio di WNV che si è avuto nell'Agosto 2008 e che ha coinvolto tre regioni: Lombardia, Emilia Romagna e Veneto.

E' interessante sottolineare che è stato condotta l'analisi filogenetica sull'amplificato di 255bp relativo ad una porzione della proteina E

VALUTAZIONE DI DIVERSI METODI DI ESTRAZIONE DI DNA/RNA DA DIVERSE MATRICI BIOLOGICHE

Per quanto riguarda le matrici biologiche sono stati impiegati tre tipi di campioni:

- linee cellulari RK-13 ed MDCK cronicamente infette con il ceppo Borna Disease Virus (BDV) H1766 di origine equina e la linea cellulare C6 cronicamente infetta con il ceppo BDV HE/80 di origine equina.
- lobo olfattivo di un equino regolarmente macellato, impiegato come tessuto nervoso.
- lobo olfattivo equino omogeneizzato ed infettato sperimentalmente con 1×10^7 cellule RK-13 od MDCK infette con il ceppo BDV H1766

Primo metodo di estrazione dell'RNA totale testato → TRIZOL LS Reagent(Q-BIOgene)

• **Omogeneizzazione manuale del campione** : utilizzare una quantità di tessuto nervoso (lobo olfattivo) pari a 0,1-0,5 mg. Tagliare in piccolissimi pezzetti l'appropriata quantità di tessuto nervoso mediante un bisturi sterile, aggiungere 750 μ l di TRIZOL LS Reagent ed omogeneizzare mediante l'impiego di un pestello sterile. Questo campione rappresenta il controllo negativo. In parallelo è stato allestito il controllo positivo seguendo il seguente schema: prelevare 950 μ l di cellule RK-13 ed MDCK infette con il ceppo H1766, oppure C6 infette con il ceppo HE/80, centrifugare, eliminare il surnatante e risospendere in 200 μ l di PBS. Prelevare 30 μ l di cellule infette (corrispondenti a 1×10^7 cellule) ed aggiungerle al tessuto nervoso omogeneizzato.

• **Fase di separazione :**

- vortexare i campioni;
- incubare a 30°C per 15 minuti;
- aggiungere 200 μ l di cloroformio;
- vortexare;
- incubare a 30°C per 10 minuti;
- centrifugare a 12.000 rpm, per 15 minuti a 4°C;
- prelevare il surnatante.

• **Fase di precipitazione :**

- aggiungere al surnatante di ciascun campione un ugual volume di isopropanolo;
- vortexare;
- incubare a 30°C per 20 minuti;
- centrifugare a 12000 rpm, per 10 minuti a 4°C;
- eliminare il surnatante facendo attenzione a non rimuovere il pellet costituito dall'RNA;
- lavare il pellet con 1 ml di etanolo al 75%;
- centrifugare a 7500 rpm, per 10 minuti a 4°C;
- eliminare l'etanolo al 75%;
- asciugare il pellet a temperatura ambiente;

- risospendere il pellet con 50 µl di H2O-DEPC;
- incubare per 10 minuti a 60°C;
- verificare la quantità e il grado di purezza dell'RNA estratto;
- conservare l'RNA a -20°C.

Secondo metodo di estrazione dell'RNA totale testato→FastRNA® Pro Green kit (QIO-BIOgene)

· ***Omogeneizzazione del campione*** : utilizzare una quantità di tessuto nervoso (lobo olfattivo) pari a 0,1-0,5 mg. Porre l'appropriata quantità di tessuto nervoso nell'apposita provetta contenente la Lysing Matrix D, aggiungere 1 ml di RNApro™ Solution ed omogeneizzare mediante l'impiego dell'apparecchiatura FastPrep® Instrument per 40 secondi alla velocità di 6.0. Questo campione rappresenta il controllo negativo. In parallelo è stato allestito il controllo positivo seguendo il seguente schema: prelevare 950µl di cellule RK-13 ed MDCK infette con il ceppo H1766,oppure C6 infette con il ceppo HE/80, centrifugare , eliminare il surnatante e risospendere in 200µl di PBS. Prelevare 30µl di cellule infette(corrispondenti a 1 X 10⁷ cellule)ed aggiungerle nell'apposita provetta contenente la Lysing Matrix D,il tessuto nervoso da omogeneizzare e 1 ml di RNApro™ Solution.

- ***Recupero del campione omogeneizzato*** :
- centrifugare il campione,contenuto nella provetta dotata di Lysing Matrix D, a 12.000 rpm, per 5 minuti a 4°C;
- prelevare 800 µl di surnatante e porlo in una eppendorf sterile.

- ***Fase di separazione:***
- incubare per 5 minuti a temperatura ambiente;
- aggiungere 300 µl di cloroformio e vortexare per 10 secondi;
- incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (per permettere la dissociazione delle nucleoproteine ed aumentare la purezza dell'RNA);
- centrifugare a 12.000 rpm, per 5 minuti a 4°C;
- prelevare il surnatante senza intaccare l'interfaccia e porlo in un eppendorf pulita.

- ***Fase di precipitazione*** :
- aggiungere 500 µl di etanolo al 100% mantenuto a temperatura ambiente ed incubare a -20°C per 30 minuti;
- centrifugare a 12.000 rpm,per 15 minuti a 4°C;
- eliminare l'etanolo al 100%;
- lavare il pellet con 500 µl di etanolo al 75%;
- centrifugare a 13.000 rpm,per 15 minuti a 4°C;
- eliminare l'etanolo al 75%;
- asciugare il pellet a temperatura ambiente;
- risospendere il pellet con 50 µl di H2O-DEPC;
- verificare la quantità e il grado di purezza dell'RNA estratto;
- conservare l'RNA a -20°C.

Terzo metodo di estrazione dell'RNA totale testato→TRIZOL LS Reagent(Q-BIOgene) con colonnine silica-based (Qiagen)

· ***Omogeneizzazione manuale del campione*** : utilizzare una quantità di tessuto nervoso (lobo olfattivo) pari a 0,1-0,5 mg. Tagliare in piccolissimi pezzetti l'appropriata quantità di tessuto nervoso mediante un bisturi sterile, aggiungere 750 µl di TRIZOL LS Reagent ed omogeneizzare mediante l'impiego di un pestello sterile. Questo campione rappresenta il controllo negativo. In parallelo è stato allestito il controllo positivo seguendo il seguente schema: prelevare 950µl di cellule RK-13 ed MDCK infette con il ceppo H1766, oppure C6 infette con il ceppo HE/80, centrifugare, eliminare il surnatante e risospendere in 200µl di PBS. Prelevare 30µl di cellule infette (corrispondenti a 1 X 10⁷ cellule) ed aggiungerle al tessuto nervoso omogeneizzato.

· ***Fase di separazione :***

- vortexare i campioni;
- incubare a 30°C per 15 minuti;
- aggiungere 200 µl di cloroformio;
- vortexare;
- incubare a 30°C per 10 minuti;
- centrifugare a 12.000 rpm, per 15 minuti a 4°C;
- prelevare il surnatante e porlo in un eppendorf sterile.

· ***Fase di purificazione :***

- aggiungere un ugual volume di etanolo al 100% mantenuto a temperatura ambiente;
- vortexare;
- applicare il campione alla colonnina silica-based (QIAamp Viral Qiagen);
- centrifugare a 8000 rpm, per 5 minuti a temperatura ambiente;
- lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW1;
- centrifugare ad 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
- lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW2;
- centrifugare a 12000 rpm, per 3 minuti a temperatura ambiente;
- centrifugare nuovamente a 12000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
- aggiungere alla colonnina silica-based (QIAamp Viral Qiagen) 50 µl di AVE Buffer Elution (Qiagen);
- incubare per 1 minuto a temperatura ambiente;
- centrifugare a 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente.
- verificare la quantità e il grado di purezza dell'RNA estratto;
- conservare l'RNA a -20°C.

Quarto metodo di estrazione dell'RNA totale testato→FastRNA® Pro Green kit (QIO-BIOgene) con colonnine silica-based (Qiagen)

· ***Omogeneizzazione del campione:*** utilizzare una quantità di tessuto nervoso (lobo olfattivo) pari a 0,1-0,5 mg. Porre l'appropriata quantità di tessuto nervoso nell'apposita provetta contenente la Lysing Matrix D, aggiungere 1 ml di RNAproTM Solution ed omogeneizzare mediante l'impiego dell'apparecchiatura FastPrep®

Instrument per 40 secondi alla velocità di 6.0. Questo campione rappresenta il controllo negativo. In parallelo è stato allestito il controllo positivo seguendo il seguente schema: prelevare 950µl di cellule RK-13 ed MDCK infette con il ceppo H1766,oppure C6 infette con il ceppo HE/80, centrifugare , eliminare il surnatante e risospendere in 200µl di PBS. Prelevare 30µl di cellule infette(corrispondenti a 1×10^7 cellule)ed aggiungerle nell'apposita provetta contenente la Lysing Matrix D,il tessuto nervoso da omogeneizzare e 1 ml di RNAPro™ Solution.

· ***Recupero del campione omogeneizzato :***

- centrifugare il campione,contenuto nella provetta dotata di Lysing Matrix D, a 12.000 rpm, per 5 minuti a 4°C;
- prelevare 800 µl di surnatante e porlo in una eppendorf sterile.

· ***Fase di separazione:***

- incubare per 5 minuti a temperatura ambiente;
- aggiungere 300 µl di cloroformio e vortexare per 10 secondi;
- incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (per permettere la dissociazione delle nucleoproteine ed aumentare la purezza dell'RNA);
- centrifugare a 12.000 rpm, per 5 minuti a 4°C;
- prelevare il surnatante senza intaccare l'interfaccia e porlo in un eppendorf pulita.

· ***Fase di purificazione :***

- aggiungere un ugual volume di etanolo al 100% mantenuto a temperatura ambiente;
- vortexare;
- applicare il campione alla colonnina silica-based (QIAamp Viral Qiagen):
- centrifugare a 8000 rpm, per 5 minuti a temperatura ambiente;
- lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW1;
- centrifugare ad 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
- lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW2;
- centrifugare a 12000 rpm, per 3 minuti a temperatura ambiente;
- centrifugare nuovamente a 12000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
- aggiungere alla colonnina silica-based(QIAamp Viral Qiagen) 50 µl di AVE Buffer Elution(Qiagen);
- incubare per 1 minuto a temperatura ambiente;
- centrifugare a 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente.
- verificare la quantità e il grado di purezza dell'RNA estratto;
- conservare l'RNA a -20°C.

ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DA CAMPIONI DI CERVELLO OVINO FISSATI IN FORMALINA

Nel corso della ricerca è stato estratto l'RNA totale da campioni di cervello fissati in formalina di due pecore, venute a morte con sindrome vestibolare, atassia ai 4 arti e con lesioni compatibili con la malattia di Borna. In particolare, in entrambi i soggetti, le lesioni istopatologiche erano caratterizzate da marcati fenomeni infiammatori multifocali prevalentemente a carico della corteccia rinencefalica, dei nuclei della base, del talamo, dell'ippocampo, del mesencefalo, del ponte e del midollo allungato. Nelle aree più gravemente colpite, la flogosi era caratterizzata da cospicua gliosi e proliferazione di cellule bastoncellari, soprattutto a livello dell'ippocampo.

- Incubazione overnight: incubare overnight 0,1-0,5 mg di tessuto nervoso a 4°C in 1 ml di PBS;
- Fase di omogeneizzazione : incubare il tessuto a 55°C, per 3 ore in agitazione (400 rpm) in 1 ml di soluzione tampone di lisi AVL (Qiagen) a cui vengono aggiunti 100 µg/ml di Proteinasi K e 10 µl di β-mercaptoetanololo.
- Fase di separazione e di purificazione :
 - aggiungere al tessuto omogeneizzato un ugual volume di etanolo al 100% mantenuto a temperatura ambiente;
 - applicare il campione alla colonnina silica-based (QIAamp Viral Qiagen):
 - centrifugare a 8000 rpm, per 5 minuti a temperatura ambiente;
 - lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW1;
 - centrifugare ad 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW2;
 - centrifugare a 12000 rpm, per 3 minuti a temperatura ambiente;
 - centrifugare nuovamente a 12000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - aggiungere alla colonnina silica-based (QIAamp Viral Qiagen) 50 µl di AVE Buffer Elution (Qiagen);
 - incubare per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - centrifugare a 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente.
 - verificare la quantità e il grado di purezza dell'RNA estratto;
 - conservare l'RNA a -20°C.

VALUTAZIONE DEI DIVERSI METODI DI ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

Per la valutazione del metodo di estrazione dell'RNA totale più appropriato sono stati confrontati i seguenti due protocolli :

- TRIZOL LS Reagent (Q-BIOgene)

- TRIZOL LS Reagent(Q-BIOgene) con colonnine silica-based (Qiagen)

Il rapporto A260 / A280 è lo stesso sia per la precipitazione effettuata seguendo le istruzioni riportate per il TRIZOL LS Reagent(Q-BIOgene) che per la colonnina silica-based(QIAamp Viral Qiagen). Invece, il rapporto A260/A230 è più elevato per la colonnina silica-based che per la precipitazione ed implica una migliore qualità dell'RNA totale per la stessa colonnina. In effetti, il valore A230 è più piccolo per la colonnina silica-based ed è correlato alla presenza di fenolo-cloroformio.

La quantità di materiale estratto (RNA totale) è più elevata per la precipitazione (200 – 250 ng/μl) rispetto alla colonnina silica-based (100-150 ng/μl), ma la qualità dell'RNA totale relativo alla colonnina silica-based è migliore dell'RNA totale ottenuto con la precipitazione.

Il confronto è stato fatto anche per gli ulteriori protocolli esaminati :

- a) FastRNA® Pro Green kit (QIO-BIOgene)

- b) FastRNA® Pro Green kit (QIO-BIOgene) con colonnine silica-based (Qiagen)

Il rapporto A260/A280 è lo stesso sia per la precipitazione effettuata seguendo le istruzioni relative al FastRNA® Pro Green kit che per la colonnina silica-based(QIAamp Viral Qiagen). Inoltre, il rapporto A260/A230 è più elevato per la colonnina silica-based che per la precipitazione ed implica una migliore qualità dell'RNA totale estratto seguendo il protocollo FastRNA® Pro Green kit (QIO-BIOgene) con colonnine silica-based.

Al contrario, la quantità di materiale estratto (RNA totale) è più elevata per la precipitazione (200-260 ng/μl) che per la colonnina silica-based (120-150 ng/μl).

Per quanto riguarda l'estrazione dell'RNA totale dai campioni di cervello ovino fissati in formalina, la quantità di RNA totale estratto è pari ad 80-100 ng/μl. L'integrità dell'RNA totale estratto è stata sempre verificata in Real-time utilizzando come controllo endogeno il Kit della Applied Biosystems 18S rRNA eucariotico contenente primers e sonda (VIC-Tamra)specifici per questo target. I valori dei Ct ottenuti sono compresi tra 31,16 e 38,8.

ESTRAZIONE DELL'RNA VIRALE DAL TESSUTO NERVOSO

- Omogeneizzazione del campione : utilizzare una quantità di tessuto nervoso pari a 0,1-0,5 mg. Porre l'appropriata quantità di tessuto nervoso nell'apposita provetta contenente la Lysing Matrix D, aggiungere 1 ml di tampone fosfato isotonic PBS 1X ed omogeneizzare mediante l'impiego dell'apparecchiatura FastPrep® Instrument per 40 secondi alla velocità di 6.0.

- Recupero del campione omogeneizzato :

- centrifugare il campione, contenuto nella provetta dotata di Lysing Matrix D, a 12.000 rpm, per 5 minuti a 4°C;
- prelevare 140 μl di surnatante e porlo in una eppendorf sterile.
-

- Fase di purificazione :
 - aggiungere ai 140 µl di campione 560 µl di Buffer AVL contenente il carrier(Qiagen) ;
 - vortexare;
 - incubare il campione a temperatura ambiente per 10 minuti;
 - aggiungere 560 µl di etanolo al 100% mantenuto a temperatura ambiente;
 - applicare il campione alla colonnina silica-based (QIAamp Viral Qiagen);
 - centrifugare a 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW1;
 - centrifugare ad 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - lavare la colonnina silica-based con 500 µl di Buffer AW2;
 - centrifugare a 12000 rpm, per 3 minuti a temperatura ambiente;
 - centrifugare nuovamente a 12000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - aggiungere alla colonnina silica-based(QIAamp Viral Qiagen) 60 µl di AVE Buffer Elution(Qiagen);
 - incubare per 1 minuto a temperatura ambiente;
 - centrifugare a 8000 rpm, per 1 minuto a temperatura ambiente.
 - verificare la quantità e il grado di purezza dell'RNA estratto;
 - conservare l'RNA a -20°C.

- Lo stesso protocollo può essere applicato al tessuto nervoso per l'estrazione del DNA.

BIBLIOGRAFIA consultata per la parte relativa alla realizzazione di PCR Real Time simultanee per EHV 1, EHV 4, WNDV E BDV

- Allen G.P. (2006). Antemortem detection of latent infection with neuropathogenic strains of equine herpesvirus-1 in horses. *Am. J. Vet. Res.* 67 (8): 1401-1405.
- Allen G.P. and Breathnach C.C. (2006). Quantification by real-time PCR of the magnitude and duration of leucocyte-associated viraemia in horses infected with neuropathogenics vs. non neuropathogenic strains of EHV-1. *Equine Vet. J.* 38 (3): 252-257.
- Allen G.P. and Bryans J.T. (1986). Molecular epidemiology, pathogenesis and prophylaxis of equine herpesvirus-1 infections. In: *Progress in Veterinary Microbiology and Immunology*, Vol. 2, Pandey R., ed. Karger, Basel, Switzerland & New York, USA: 78-144.
- Anderson J. F., Andreadis T. G., Vossbrinch C. R., Tirrel S., Wakem E. M., French R. A., Garmendia A. E. and Van Kruiningen H. J. (1999). Isolation of West Nile virus from mosquitoes, crow, and a Cooper's hawk in Connecticut. *Science* 286: 2331-2333.
- Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I. and Nowotny N. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (2): 225-231.

- Berg M., Ehrenborg C., Blomberg J., Pipkorn R. and Berg A. L. (1998). Two domains of the Borna disease virus p40 protein are required for interaction with the p23 protein. *J. Gen. Virol.* 79: 2957-2963.
- Berg M., Johansson M., Montell H. And Berg A.-L. (2001). Wild birds as a possible reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol. Infect.* 127: 173-178.
- Berthet F. X., Zeller H. G., Drouset M. T., Rauzier J., Digoutte J. P. and Deubel V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 9) : 2293-2297.
- Borchers K. and Slater J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J. Virol. Methods* 45: 331-336.
- Borchers K., Thein R. and Sterner-Kock A. (2006) Pathogenesis of equine herpesvirus-associated neurological disease: a revised explanation. *Equine Vet.* 38 (3): 283-287.
- Brinton M. A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 56: 371-402.
- Crabb B.S and Studdert M.J. (1995). Equine herpesviruses 4 (equine rhinopneumonitis virus) and 1(equine abortion virus). *Adv. Virus Res.* 45: 153-190.
- Dauphin G., Legay V., Sailleau C., Smondack S., Hammoumi S. and Zientara S. (2001) Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (*Vulpes vulpes*). *J. Gen. Virol.* 82: 2199-2204.
- Diallo I.S., Hewitson G., Wright L., Rodwell, B.J. and Corney B.G.(2006) Detection of equine herpesvirus type1 using a real-time polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 131 (1): 92-98.
- Dunowska M.,Wilks C.R., Studdert M.J. and Meers J. (2002). Equine respiratory viruses in foals in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 50 (4):140-147.
- Dürwald, R., Kolodziejek J., Muluneh A., Herzog S. and Nowotny N. (2006) Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host population *Microbes and Infection.* *Microbes and Infection* 8, 917-929)
- Eisler D. L., McNabb A., Jorgensen D. R. and Isaac-Rentol J. L. (2004). Use of an internal positive control in a multiplex reverse transcription-PCR to detect West Nile virus RNA in mosquito pools. *J. Clin. Microbiol.* 42 (2): 841-843.
- Elia G., Decaro N., Martella V., Campolo M., Desario C., Lo Russo E., Cirone F. and Buonavoglia C. (2006). Detection of equine herpesvirus type 1 by real time PCR. *J. Virol. Methods* 133 (1): 70-75.
- Gunn H.M. (1992). A direct fluorescent antibody technique to diagnose abortion caused by equine herpesvirus. *Irish Vet. J.* 44: 37-40.
- Hilbe M, Herrsche R., Kolodzieiek J., Nowotny N., Zlinszky K. And Ehrensperger F. (2006). Shrews as reservoir host of borna disease virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12 (4): 675-677.
- Hussey S.B., Clark R., Lunn K.F., Breathnach C., Soboll G., Whalley J.M. and Lunn D.P. (2006). Detection and quantification of equine herpesvirus-1 viremia

- and nasal shedding by real-time polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18 (4): 335-342.
- Kolodziejek J., Durrwald R., Herzog S., Ehrensperger F., Lussy H., Nowotny N. (2005). Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 2): 385-398.
 - Kydd J.H and Smith K.C. (2006). Equine herpesvirus neurologic disease: reflections from across the pond. *J. Vet. Intern. Med.* 20 (3): 467-468.
 - Lanciotti R. S., Kerst A. J., Nasci R. S., Godsey M. S., Mitchell C. J., Savane H. M., Komar N., Panella N. A., Allen B. C., Volpe K. E., Davis B. S. and Roehrig J. T. (2000). Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a Taq Man Reverse Transcriptase-PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 38 (11): 4066-4071.
 - Lanciotti R. S., Roehrig J. T., Deubel V., Smith J., Parker M., Steele K., Volpe K. E., Crabtree M. B., Scherret J. H., Hall R. A., MacKenzie J. S., Cropp C. B., Panigrahy B., Ostlund E., Schmitt B., Malkinson M, Banet C., Weissman J., Komar N., Savage H. M., Stone W., McNamara T. and Gubler J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern U. S. *Science* 286: 2333-2337.
 - Lanciotti R. S., Ebel G. D., Deubel V., Kerst A. J., Murri S., Meyers R., Bowwen M., McKinney N., Morrill W. E., Crabtree M. B., Kramer L. D. and Roehrig J. T. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile Virus strains isolated from the United States, Europe, and Middle East. *Virol.* 299: 96-105.
 - Lawrence G.L., Gilkerson J., Love D.N., Sabine M. & Whalley J.M. (1994). Rapid, single-step differentiation of equid herpesvirus 1 and 4 from clinical material using the polymerase chain reaction and virus-specific primers. *J. Virol. Methods* 47: 59-72.
 - Liu W.J., Chen H. B. And Khromykh A.A. (2003). Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2a in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J. Virol.* 77 (14): 7804-7813.
 - Maeda K., Mizukoshi F., Hamano M., Kai K., Kondo T. and Matsumura T. (2005). Identification of another B-cell epitome in the type-specific region of equine herpesvirus 4 glycoprotein G. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12 (1): 122-124.
 - Molinkova D., Celer V. Jr. and Jahn P. (2004). Isolation and partial characterization of equine herpesvirus type 1 in Czechia . *Folia Microbiol. (Praha)* 49 (5): 605-611.
 - Nakamura Y., Asahi S., Nakaya T., Bahamani M. K., Saitoh S., Yasui K., Mayama H., Hagiwara K., Ishihara C. and Ikuta K. (1996). Demonstration of Borna Disease Virus RNA in Peripheral Blood Mononuclear Cells Derived from Domestic Cats in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 34(1): 188-191.

- Nowotny N., Kolodziejek J., Jehle C. O., Suchy A., Staeheli P. and Schwemmler M. (2000). Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J. Virol.* 74(12): 5655-5658.
- Oustlund E. (1993). The equine Herpesvirus. *Veterinary Clinic. North America* 9: 283-294.
- Patel J.R. and Heldens J. (2005). Equine herpesviruses 1(EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology,disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Vet. J.* 170 (1): 14-23.
- Pleschka S., Staeheli P., Kolodziejek J., Richt J.A., Nowotny N. and Schwemmler M. (2001). Animal: RNA Viruses Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2681-2690.
- Pleschka S., Staeheli P., Kolodziejek J., Richt J.A., Nowotny N. and Schwemmler M. (2001). Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna Disease Virus. *J. Gen. Virol.* 82: 2681-2690.
- Poidinger M., Hall R. A. and Mackenzie J. S. (1996). Molecular Characterization of Japanese Encephalitis Serocomplex of the Flavivirus Genus. *Virology* 218: 417-421.
- Pusterla N., Leutenegger C.M., Wilson W.D., Watson J.L., Ferraro G.L. and Madigan J.E. (2005). Equine herpesvirus-4 kinetics in peripheral blood leukocytes and nasopharyngeal secretions in foals using quantitative real-time TaqMan PCR. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17 (6): 578-581.
- Reilly F.K. (2006). Questions applications and conclusions in equine herpesvirus study. *Am. J. Vet. Res.* 67 (11):1820.
- Savage H. M., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatos N., Lanciotti R., Vladimirescu A., Laiv L., Ungureanu A., Romanca C. and Tsai T. F. (1996). Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania, 1996, with serological and molecular characterization of a virus from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61: 600-611.
- Scherret J. H., Mackenzie J. S., Hall R. A., Deubel V. And Gould E. A. (2002). Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 267: 373-390.
- Schindler A.R.,Vogtlin A., Hilbe M., Puorger M., Zlinszky K., Ackermann M., Ehrensperger F. (2006). Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol. Cell. Probes* Aug. 30; [Epub ahead of print].
- Shirato K., Miyoshi H., Kariwa H. and Takashima I. (2005). Detection of West Nile Virus and Japanese encephalitis virus using real-time PCR with a probe common to both viruses. *J. Virol. Methods.* 126 (1-2): 119-125.
- Slater J.D., Lunn D.P., Horohov D.W., Antczak D.F., Babiuk L., Breathnach C., Chang Y.W., Davis-Poynter N., Edington N., Ellis S., Foote C., Goehring L., Kohn C.W., Kydd J., Matsumura T., Minke J., Morley P., Mumford J., Neubauer T., O'Callaghan D., Osterriender K. Reed S., Smith K., Townsend H., Van der Meulen K., Whalley M. and Wilson W.D. Report of the equine herpesvirus-1,

- Havermeyer Workshop, San Gimignano, Tuscany, June 2004. (2006). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15: 111(1-2) : 3-13.
- Smith K. (2005). Equine herpesviruses 1 and 4: creeping to a solution. *Vet. J.* 170 (1): 6-7.
 - Sorg I. and Metzler A. (1995). Detection of Borna Disease Virus RNA in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Brain Tissues by Nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (4): 821-823.
 - Telford E. A., Watson M.S., McBride K. and Davison A.J. (1992). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* 189: 304-316.
 - Telford E.A., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A. and Davison A.J. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 5): 1197-1203.
 - Ternovoi V. A., Protopopova E. V., Surmach S.G., Gazetdinov M.V., Zolotykh S.I., Shestopalov A. M., Pavlenko E. V., Leonova G.N. and Loktev V. B. (2006). The genotyping of the West Nile virus in birds in the far eastern region of Russia in 2002-2004. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 4: 30-35.
 - Tomonaga K., Kobayashi T. and Ikuta K. (2002). Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* 4: 491-500.
 - Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell L. and Nedelcu N. I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* 352: 767-771.
 - Vahlennkamp T.W., Konrath A., Weber M. and Müller H. (2002). Persistence of Borna Disease Virus in Naturally Infected Sheep. *J. Virol.* 76(19): 9735-9743.
 - Van Regenmortel M. H.V., Fauquet C. M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M., Lemon S., Maniloff J., Mayo M. A., McGeoch D., Pringle CR. and Wickner RB (eds). (2000). Virus Taxonomy. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, New York San Diego.
 - Varrasso A., Dynon K., Ficorilli N., Hartley C.A., Studdert M.J. and Drummer H.E. (2001). Identification of equine herpesviruses 1 and 4 by polymerase chain reaction. *Aust. Vet. J.*, 79: 563-569.
 - Verheyen, K., Newton, J.R., Wood, J.L.N., Birch-Machin, I., Hannant, D. and Humberstone, R. W. (1998). Possible case of EHV-4 ataxia in Warmblood mare. *Vet Rec* 143 (16): 456.
 - Wagner W.N., Bogdan J., Haines D., Townsend H.G.G. and Misra V. (1992). Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 38:1193-1196.

***REALIZZAZIONE DI UN SET DIAGNOSTICO PER EHV 1, EHV 4,
WNDV E BDV MEDIANTE TECNOLOGIA MICROARRAY***

L'unità operativa 10 si proponeva la realizzazione di un metodo molecolare rapido, sensibile e diretto per l'identificazione di infezioni virali multiple con il valore aggiunto della possibile genotipizzazione dei virus identificati in campioni biologici ottenuti da cavalli in un'unica sessione di analisi mediante tecnologia microarray.

La peculiarità del sistema proposto risiede nella capacità di analisi simultanea di molteplici specie virali e di eventuali mutanti delle stesse non ancora utilizzabili dalle metodiche diagnostiche "standard", eliminando la necessità di colture cellulari dei campioni

Lo strumento diagnostico in questione, oltre all'identificazione dei virus, essendo in grado di caratterizzare e tipizzare simultaneamente gli stipiti rilevati, consente di avere in tempi rapidissimi anche informazioni fondamentali per valutazioni di ordine epidemiologico in relazione all'origine degli stipiti circolanti.

DISPONIBILITÀ DI MATERIALI DI RIFERIMENTO

Sono stati ottenuti i seguenti materiali di riferimento:

EHV-1 e EHV-4 – *Equid herpesvirus 1* e *Equid herpesvirus 4*

- EHV-1 ceppo Kentucky D
- EHV-4 ceppo 405/75

WNV – *West Nile virus*

WNV strain Egypt101

BDV- *Bornavirus*

cellule MDCK persistentemente infette da BDV

cellule ERK13 persistentemente infette da BDV

INDIVIDUAZIONE DELLE SONDE PER TECNOLOGIA MICROARRAY

L'individuazione delle sonde per tecnologia microarray deriva dall'esecuzione di due sotto fasi:

- Studio dei diversi genomi virali per la scelta delle regioni target da sottoporre ad amplificazione (fase 1B; mesi 1-3);
- Design delle sonde specifiche per la tecnologia microarray (fase 1L; mesi 3-5).

Sono di seguito descritte le strategie comuni per il disegno delle sonde e, successivamente, presi in considerazione i singoli virus.

Studio dei diversi genomi virali per la scelta delle regioni *target* da sottoporre ad amplificazione.

Inizialmente, sulla base delle sequenze specifiche pubblicate in banca dati dei virus EHV-1, EHV-4, WNV, BDV e di virus ad essi correlati, sono state studiate e selezionate le regioni *target* utili per il disegno delle sonde specifiche per la tecnologia microarray. In particolare le sequenze di tutti i geni presi in considerazione sono state allineate

utilizzando CLUSTAL W, un programma implementato nel software Bioedit versione 7.0.5.2, per la visualizzazione, l'allineamento e l'analisi di sequenze di acidi nucleici e proteine.

Ai fini diagnostici si è deciso di identificare le famiglie virali, le eventuali sottofamiglie (limitatamente alle *Herpesviridae*) o gli eventuali gruppi e sierogruppi (limitatamente alle *Flaviviridae*) il genere e la specie virale. A tal fine sono state ricercate regioni sia di elevata sia di bassa omologia all'interno dei genomi completi dei diversi virus geneticamente correlati. A completamento dell'iter diagnostico è stato necessario anche identificare, ove possibile, i ceppi virali attraverso la ricerca di marcatori molecolari per l'analisi della diversità genetica caratteristica di ogni singolo ceppo. Le regioni *target* specifiche selezionate sono riportate di seguito per ogni virus.

Design delle sonde specifiche per la tecnologia microarray.

I due parametri fondamentali per la buona riuscita di un array diagnostico sono rappresentati dal grado di conservazione del gene *target* e dalla lunghezza dell'oligonucleotide utilizzato come sonda per il rilievo della regione *target* [Bodrossy e Sessitsch, 2004]. La selezione del gene *target* specifico per ogni virus verrà descritta di seguito. Per quanto riguarda la lunghezza della sonda, esistono due strategie per l'identificazione di virus mediante tecnologia microarray: la prima che prevede l'utilizzo di sonde corte (15-30-mer), la seconda che utilizza sonde lunghe (50-100-mer) [Loy e Bodrossy, 2006]. La prima è una strategia che consente la caratterizzazione di specie e genotipo virale e si basa sull'identificazioni di mutazioni puntiformi all'interno di regioni conservate e specifiche, ed è paragonabile alla strategia più conosciuta tra gli array di espressione per l'identificazione di SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). La seconda strategia si basa sull'utilizzo di sonde più lunghe, derivate da regioni conservate, che consentono l'identificazione della specie virale e che sono utilizzate inoltre per la scoperta di nuovi virus ("*viral discovery*").

Gli sviluppi più recenti della tecnologia microarray a scopo diagnostico prevedono più frequentemente l'utilizzo delle sonde lunghe [Kostic et al., 2005]. La maggiore lunghezza delle sonde permette di ottenere una maggiore capacità di legame rispetto alle sonde corte, aumentando in questo modo la sensibilità [Bodrossy e Sessitsch, 2004]. Tuttavia il limite per differenziare due sequenze è rappresentato da un 75-80% di omologia di sequenza. Questo si potrebbe tradurre in una ridotta specificità delle sonde lunghe rispetto alle sonde corte, sebbene l'ottimizzazione delle condizioni di ibridazione e di altri parametri, tra cui l'uso di diversi *target* per lo stesso gruppo tassonomico, potrebbero superare tali possibilità. Il vero limite è pertanto legato al fatto che non è sempre possibile identificare ceppi virali se questi differiscono tra loro per singole mutazioni puntiformi. Questo problema può essere risolto utilizzando diverse strategie. È possibile disegnare sonde multiple specifiche per una sequenza *target*, oppure selezionare diversi e numerosi geni *target* specifici per il microrganismo che si sta ricercando. In questi casi è soprattutto la scelta corretta dei diversi geni *target* che stabilisce la specificità, piuttosto che la sonda stessa [Kostic et al., 2005]. Le sonde lunghe, in virtù delle loro caratteristiche di sensibilità e ridotta specificità, possono essere utilizzate anche per identificare nuovi virus circolanti: questi virus, sconosciuti ma geneticamente correlati, a livello di geni più conservati, ad altri virus già noti, si

possono legare in modo aspecifico a queste sonde. Viceversa le sonde corte, molto specifiche, escludono la possibilità di cross-ibridazione con ceppi virali non completamente caratterizzati e di fatto non consentono di individuare nuovi ceppi virali circolanti.

La strategia per il disegno delle sonde da utilizzare in questo progetto si basa sulla situazione epidemiologica italiana per quanto riguarda la circolazione di virus causa di encefalite nei cavalli. La presenza di herpesvirus equini nel nostro Paese, soprattutto EHV-1, è storicamente nota mentre ci sono solo indicazioni sulla possibile circolazione di BDV e di WNV. In particolare in Italia, dopo la conferma diagnostica della presenza nel 1998 di WNV nei cavalli, sono stati riportati negli anni seguenti rari casi di sieropositività per WNV in animali fino alle evidenze epidemiche verificatesi a partire dal 2008 in Italia settentrionale, successivamente all'avviamento del progetto di ricerca. È stato quindi recentemente dimostrato che nel nostro Paese circolano, assieme ai Lineages 1 e 2 del WNV, anche altri *Flavivirus*. Inoltre la diffusione di BDV in Italia non è stata ancora valutata completamente: sono stati per ora segnalati casi nei bovini e negli ovini e c'è qualche indicazione circa la sua presenza nei cavalli [Caramelli et al., 1996; Pisoni et al., 2006]. In seguito all'identificazione di un ceppo di BDV austriaco completamente diverso dagli altri, Nowotny e collaboratori ipotizzano che ceppi di BDV divergenti dai "classici" possono essere presenti in aree anche non endemiche e che questi ceppi non sono diagnosticabili con le normali tecnologie di PCR [Nowotny et al., 2000]. Non si può escludere che questa situazione riguardi l'Italia. Risulta quindi importante aver a disposizione un supporto diagnostico che permette di identificare anche nuovi virus/ceppi circolanti e a tal fine risulta più idonea la strategia che prevede l'utilizzo di sonde lunghe.

Per il disegno di queste sonde sono state selezionate regioni di circa 100 nucleotidi che avessero le seguenti caratteristiche: omologia molto elevata per identificare una regione comune tra diversi virus oppure differenze nucleotidiche tali da consentire il disegno di sonde specifiche per ogni virus da identificare. Come già anticipato, di seguito sono riportate le regioni analizzate per disegnare le sonde per l'identificazione dei virus EHV-1, EHV-4, WNV e BDV.

EHV-1 e EHV-4- Equid herpesvirus-1 e Equid herpesvirus-4

Studio del genoma virale degli *Herpesvirus* (HV) per la scelta delle regioni *target* da sottoporre ad amplificazione

La famiglia delle *Herpesviridae* comprende oltre 100 specie virali isolate da una grande varietà di vertebrati. È ulteriormente suddivisa in tre sottofamiglie: *Alfa-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae* in base alle caratteristiche biologiche dei virus che vi appartengono (ospite, durata del ciclo riproduttivo, citopatogenicità e sito dell'infezione latente) ma anche in funzione delle più recenti ricostruzioni delle relazioni filogenetiche eseguite sulla base di sequenze aminoacidiche e nucleotidiche disponibili [McGeoch et al., 2006].

Gli herpesvirus dei cavalli presi in considerazione in questo progetto, in quanto tra i principali responsabili di sindromi encefaliche degli equidi, sono l'*Equid herpesvirus 1 e 4* (EHV-1 e EHV-4) [Patel et al., 2005]. Essi appartengono alla sottofamiglia delle *Alphaherpesvirinae*, genere *Varicellovirus*. Nugent e collaboratori hanno recentemente descritto diversi ceppi di EHV-1: si distinguono ceppi neurovirulenti e ceppi non neurovirulenti, indipendentemente dall'origine geografica, sulla base di una singola mutazione puntiforme a livello di specifici marcatori molecolari [Nugent et al. 2006]. Sulla base di analisi tramite enzimi di restrizione sui genomi sono stati descritti anche 23 ceppi per il virus EHV-4. Tuttavia dall'analisi delle sequenze dei prodotti di amplificazione corrispondenti ai geni che codificano per glicoproteine più conservate non è stato possibile identificare differenze sufficienti per distinguere diversi ceppi di EHV-4 [Maeda et al., 2005].

Sempre nel genere *Varicellovirus* sono compresi altri virus che colpiscono gli equidi: l'*Equid herpesvirus 3* (EHV-3) agente del morbo coitale maligno, l'*Equid herpesvirus 8* (EHV-8, precedentemente conosciuto come *Asinine herpesvirus 3*, AHV-3) responsabile di sindromi respiratorie nell'asino e l'*Equid herpesvirus 9* (EHV-9) isolato nella gazzella di Thomson [Ficorilli et al. 1995, Borchers et al., 2006]. Al genere *Varicellovirus* appartengono anche altri virus erpetici che infettano animali di interesse veterinario, quali *Suid herpesvirus 1* (SuHV-1, Pseudorabies virus), *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1), *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5) *Caprine herpesvirus 1* (CpHV-1), *Felid herpesvirus 1* (FeHV-1). All'interno di questo genere è compreso anche l'*Human herpesvirus 3* (HHV-3). Infine per l'*Equid herpesvirus 6* (EHV-6, noto anche come *Asinine herpesvirus 1*, AHV-1) è tuttora incerta la collocazione all'interno del genere *Varicellovirus*.

Alla stessa sottofamiglia appartengono altri generi virali, tra cui il genere *Simplexvirus* all'interno del quale sono classificati lo *Human herpesvirus 1* (HHV-1) e lo *Human herpesvirus 2* (HHV-2).

La sottofamiglia *Betaherpesvirinae* è caratterizzata da virus importanti in ambito umano quali gli appartenenti al genere *Cytomegalovirus* (*Human herpesvirus 5*, HHV-5 o *Human cytomegalovirus*) e *Roseolovirus* (*Human herpesvirus 6*, HHV-6 e l'*Human herpesvirus 7*, HHV-7).

All'interno della sottofamiglia delle *Gammaherpesvirinae* sono compresi diversi generi virali, tra i quali il genere *Rhadinovirus*, al cui interno sono classificati altri virus che infettano gli equini, quali l'*Equid herpesvirus 2* (EHV-2) e l'*Equid herpesvirus 5* (EHV-5), e gli asini, quale l'*Equid herpesvirus 7* (EHV-7, noto anche come *Asinine herpesvirus 2*, AHV-2). A questo genere appartengono anche altri virus di interesse veterinario (*Bovine herpesvirus 4* –BoHV-4–, *Ovine herpesvirus 2*-OvHV-2-) e medico (*Human herpesvirus 8*, HHV-8 o *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*). Infine nella sottofamiglia *Gammaherpesvirinae* sono compresi altri virus che infettano gli asini quali l'*Asinine herpesvirus 4* (AHV-4) e *Asinine herpesvirus 5* (AHV-5), non raggruppati in generi.

La lunghezza e la complessità del genoma degli HV dipendono principalmente dal successo evolutivo e dal loro caratteristico tropismo specie specifico. Sono virus a DNA a doppio filamento, lineare. I diversi membri condividono una struttura e

un'organizzazione comune del genoma: sono presenti due regioni uniche (*Long Unique Region* - U_L ; *Short Unique Region* - U_S) fiancheggiate da sequenze terminali e sequenze invertite ripetute (TR_L/IR_L TR_S/IR_S), che determinano riarrangiamenti strutturali. Queste sequenze possono essere invertite, nell'una e nell'altra elica, dando origine a quattro popolazioni molecolari di DNA che differiscono per il diverso orientamento di U_L e U_S . Di conseguenza questi genomi esistono come una combinazione di 4 isomeri funzionalmente equivalenti (Fig. 1):



Fig 1. Rappresentazione schematica della struttura del genoma della famiglia *Herpesviridae*. La riga continua rappresenta U_L e U_S , le frecce indicano le regioni ripetute TR_L/IR_L TR_S/IR_S .

Nonostante questa organizzazione comune, gli HV sono piuttosto diversi tra loro in termini di lunghezza e di sequenza genomica. La lunghezza del genoma può infatti variare da 124 a 245 kbp e di conseguenza il numero di geni codificanti proteine varia notevolmente tra i diversi virus. Il genoma codifica una varietà di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, nella sintesi del DNA e nel processamento delle proteine. Sono stati identificati alcuni geni, definiti “*core genes*”, localizzati nella regione unica del genoma, che sono conservati e presenti nelle 3 sottofamiglie [Davison, 2002]. Tuttavia esistono molteplici geni specifici per ciascuna sottofamiglia virale, come di seguito riportato.

I genomi completi di EHV-1 e EHV-4 sono stati sequenziati e presentano una struttura simile e un'omologia variabile tra il 65 e il 95% a seconda delle regioni analizzate. In particolare la sequenza completa dell'EHV-1 (ceppo di riferimento) è pari a 150.224 nt, mentre in EHV-4 è di 145.597 nt. Entrambi i virus hanno 76 geni, principalmente presenti nella U_L , ma mentre per EHV-1 ci sono tre geni duplicati nella regione ripetuta TR_S/IR_S per un totale di 79 geni, nel genoma di EHV-4 i geni duplicati nella regione TR_S/IR_S sono quattro, per un totale di 80 geni [Telford et al, 1998].

I geni maggiormente studiati per la diagnosi e la caratterizzazione dei virus erpetici sono stati individuati tramite un sistema di interrogazione specifico per l'organizzazione in un database relazionale di informazioni relative alle famiglie virali (VOCs, Virus Orthologous Clusters V2.0). Questi sistemi consentono di ottenere e di analizzare i geni, raggrupparli in famiglie e risalire ai relativi genomi, utilizzando le sequenze di riferimento depositate in banca dati, le quali vengono costantemente aggiornate. Questo strumento di analisi è necessario e utile per fare chiarezza tra le sempre più numerose sequenze genomiche ma soprattutto per uniformare la disomogeneità nell'annotazione dei genomi e dei geni ortologhi presenti nelle banche dati che sono stati classificati negli anni in modo differenti da diversi gruppi di ricerca. Questo problema è particolarmente presente nella denominazione dei geni ortologhi degli herpesvirus.

Sono stati individuati diversi geni importanti per la diagnosi di EHV-1 e EHV-4. Particolare attenzione è stata rivolta ai geni che codificano per proteine coinvolte nella

replicazione del DNA e per le glicoproteine dell'*envelope*. Queste ultime molecole infatti, essendo le principali responsabili della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata, sono anche le più variabili a livello di sequenza e quindi quelle in grado di identificare la specie o il ceppo virale. I geni più importanti individuati nel presente *report* per gli EHV sono rappresentati dal gene che codifica per la DNA polimerasi, per la glicoproteina B, per la glicoproteina G, per la glicoproteina E, per un fattore trascrizionale e per una sequenza ripetuta. La denominazione di questi geni è diversa per ogni specie di HV, pertanto in questo *report* abbiamo codificato per semplicità i geni maggiormente conservati sulla base della nomenclatura dei virus erpetici umani e i geni specifici degli equini sulla base della denominazione dell'EHV-1. Il gene che codifica per la DNA polimerasi, denominato UL30 in HHV-1 e ORF30 in EHV-1, è stato identificato come UL30. Il gene che codifica per la glicoproteina B è stato identificato come UL27, secondo la denominazione riportata per HHV-1. I geni che codificano per la glicoproteina G, per la glicoproteina E, per il fattore trascrizionale e per la sequenza ripetuta sono stati denominati, rispettivamente, ORF 70, ORF 74, ORF 64 e ORF 68, secondo quanto riportato per EHV-1.

Il gene che codifica per la DNA polimerasi (UL30) è tra i geni codificanti più conservati e più studiati nella famiglia *Herpesviridae*. Alcuni autori hanno usato *primers* degenerati in regioni molto conservate (dominio di polimerizzazione) per amplificare 18 specie appartenenti alla famiglia *Herpesviridae* [Jääkelainen et al., 2006; Ehlers et al., 1999], inoltre tale sequenza è spesso impiegata per ricostruire le relazioni filogenetiche di herpesvirus non ancora identificati in specifici gruppi tassonomici [Li et al., 2005. Marshang et al., 2006, Davison et al., 2002]. Nelle *Alphaherpesvirinae* la DNA polimerasi è un proteina lunga circa 1.220 residui aminoacidici, mentre nelle *Gammaherpesvirinae* è più corta (circa 1.010). Nella sottofamiglia *Betaherpesvirinae* si trovano differenze per HHV-6 (simile alle *Gammaherpesvirinae*) e per il HHV-5 con lunghezza paragonabile alla DNA polimerasi della sottofamiglia delle *Alphaherpesvirinae* [Karlin et al., 1994]. Nell'EHV-1 la DNA polimerasi è costituita da due subunità: la subunità catalitica (ORF30), e la subunità responsabile della processività dell'oloenzima durante l'attività di sintesi del DNA, codificata dall'ORF18 [Loregian et al., 2006]. La subunità catalitica è stata utilizzata come *marker* per distinguere i ceppi neurovirulenti dai ceppi non neurovirulenti di EHV-1, indipendentemente dall'origine geografica, sulla base di una singola mutazione puntiforme [Nugent et al., 2006].

Il gene che codifica per la glicoproteina B (UL27) appartiene ai "*core genes*" molto conservati presenti nelle 3 sottofamiglie virali [Davison et al., 2002]. Questa glicoproteina, definita gpB (ma denominata anche gp14 in EHV-1 e gp33 in EHV-4), induce la fusione dell'*envelope* con la membrana plasmatica cellulare e rappresenta quindi una proteina essenziale per la replicazione virale. Questo gene è molto utilizzato per la distinzione di specie virali: sulla base dei confronti tra sequenze utilizzando le regioni codificanti per la gpB e gpG (vedi dopo) è stato infatti identificato il virus EHV-9, considerato precedentemente come un ceppo della specie già nota EHV-1. Dall'analisi delle sequenze di UL27 sono stati recentemente descritti nuovi *Equid herpesvirus*, strettamente correlati all'EHV-1, isolati da equidi in cattività (tra cui la zebra) ma anche in specie diverse (antilopi e gazzella) di artiodattili [Borchers et al., 2006].

La glicoproteina G, codificata dal gene ORF70, ha la funzione di legare un ampio numero di chemochine ma non sembra essere essenziale al virus EHV-1 per la crescita in colture cellulari. È una glicoproteina molto studiata nell'ambito della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* perchè presenta un elevato grado di variabilità tra i suoi omologhi: viene infatti utilizzata come marcatore genetico per la ricostruzione delle relazioni molecolari nell'ambito di questa sottofamiglia [Ibrahim et al., 2006]. In particolare è stata impiegata per la classificazione dell'EHV-9 come virus distinto dall'EHV-1 e per classificare l'EHV-3 all'interno degli *Alphaherpesvirus* equini [Hartley et al., 1999, Borchers et al., 2006]. La maggior parte delle differenze di sequenza sono raggruppate a livello della regione 3' della sequenza codificante per la glicoproteina G, che corrisponde alla porzione C-terminale della proteina. È in questa porzione che sono contenuti gli epitopi specie-specifici che vengono riconosciuti dai linfociti B e che stimolano la produzione di anticorpi in cavalli infetti da EHV-1 e/o EHV-4 [Telford et al., 1998].

La glicoproteina E, codificata dal gene denominato ORF74, è una delle proteine dell'*envelope* ed è particolarmente importante ai fini diagnostici in quanto secondo il *database* da noi utilizzato sembra essere presente solo nella sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* [Albà et al., 2001]. Si tratta di una glicoproteina non essenziale nella replicazione virale, che rappresenta tuttavia un importante fattore di virulenza di EHV-1 e di altri virus appartenenti alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* tra cui HHV-1, SuHV-1, BoHV-1 e FeHV-1. La glicoproteina E è stata impiegata infatti nella produzione di vaccini vivi attenuati deleti per la glicoproteina E in programmi di eradicazione/vaccinazione per il controllo di BoHV-1 e del virus della pseudorabbia [Tsumijura et al., 2006; Damiani et al., 2000].

Il fattore trascrizionale, denominato *immediate early transactivator protein*, è una proteina coinvolta nell'espressione di geni legati alle fasi precoci della replicazione virale e viene codificato dal gene denominato ORF64 [Buczynsky et al., 2005].

Il gene che codifica per la sequenza ripetuta (ORF 68) è omologo al gene Us2 presente nell'HHV-1. Al suo interno è stata individuata una regione di circa 600 nt particolarmente polimorfica, utile per la distinzione di 6 gruppi di EHV-1. L'analisi di questo gene ha messo in evidenza una parziale sovrapposizione dei gruppi individuati rispetto alla distribuzione geografica dei ceppi [Nugent et al., 2006].

Design delle sonde specifiche per EHV-1 e EHV-4 per la tecnologia microarray

Per la selezione delle regioni utili al disegno delle sonde è stato utilizzato l'allineamento di sequenze all'interno dei genomi completi (CDS coding sequenze e/o ORF, *Open Reading Frame*) e le sequenze parziali disponibili delle specie appartenenti alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (genere *Varicellovirus*), alcuni geni conservati presenti anche nelle sottofamiglie *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (UL30 e UL27) e altri geni variabili per i virus in esame (ORF: 70, 74, 64 e 68). In particolare sono stati considerati per l'allineamento i seguenti virus importanti da un punto di vista veterinario e medico:

- **Sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*:**
 - genere *Varicellovirus*
 - *Equid herpesvirus 1* (Equine herpes virus 1, EHV-1)

- *Equid herpesvirus 4* (Equine herpes virus 4, EHV-4)
- *Equid herpesvirus 3* (AHV-3)
- *Equid herpesvirus 8* (EHV-8)
- *Equid herpesvirus 9* (EHV-9)
- *Suid herpesvirus 1* (SuHV-1, Pseudorabies virus)
- *Bovine herpesvirus 1* (BoHV-1)
- *Bovine herpesvirus 5* (BoHV-5)
- *Caprine herpesvirus 1* (CpHV-1)
- *Felid herpesvirus 1* (FeHV-1)
- *Human herpesvirus 3* (Varicella Zoster Virus, HHV-3)
- **genere *Simplexvirus***
 - *Human herpesvirus 1* (HHV-1)
 - *Human herpesvirus 2* (HHV-2)
- **Sottofamiglia *Betaherpesvirinae*:**
 - *Human herpesvirus 5* (Human Cytomegalovirus, HHV-5)
 - *Human herpesvirus 6* (HHV-6)
 - *Human herpesvirus 7* (HHV-7)
- **Sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*:**
 - *Equid herpesvirus 2* (Equine herpes virus 2, EHV-2)
 - *Equid herpesvirus 5* (Equine herpes virus 5, EHV-5)
 - *Human Herpesvirus 8* (HHV-8)
 - *Bovine herpesvirus 4* (BoHV-4)
 - *Asinine herpesvirus 4* (AHV-4)
 - *Asinine herpesvirus 5* (AHV-5)
 - *Ovine herpesvirus 2* (OvHV-2)

Sono state ricercate le regioni conservate per il disegno di sonde in grado di rilevare gli HV appartenenti alle sottofamiglie *Alpha-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*, al genere *Varicellovirus*, e le regioni variabili per l'identificazione della specie e dei ceppi virali.

Regioni per disegno sonde per le sottofamiglie *Alpha*, *Beta* e *Gammaherpesvirinae*.

In considerazione della variabilità degli HV e dei geni analizzati non è presente una regione di circa 100nt per il disegno di una sonda conservata per la famiglia *Herpesviridae* nel suo complesso.

Pertanto si è proceduto nel tentativo di identificare le singole sottofamiglie virali. Dall'analisi degli allineamenti dei virus classificati all'interno della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* non è stata individuata una regione di omologia sufficientemente ampia per disegnare sonde per questa sottofamiglia. Anche per quanto riguarda l'allineamento delle sequenze per gli HV appartenenti alla sottofamiglia *Betaherpesvirinae*, non sono state individuate delle regioni di omologia utili per identificare contemporaneamente HHV-5, HHV-6 e HHV-7. È stata invece identificata una regione di omologia meno ampia (circa 15-20 nt) per i soli virus classificati all'interno della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* che potrebbe essere utile per il disegno di sonde corte per questa sottofamiglia e che è attualmente allo studio.

È stata invece identificata una regione, a livello di gene UL30, su cui è possibile disegnare sonde con diverse posizioni di degenerazione per l'identificazione dei soli virus equini e asinini (EHV-2, EHV-5, AHV-4, AHV-5) appartenenti alla sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*, considerate come sonde per virus degli equidi della sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*.

Regioni per disegno sonde per il genere *Varicellovirus*. Ai fini diagnostici è stata individuata una regione con elevato grado di omologia, a livello di gene UL30, utile per il disegno di sonde con un numero elevato di nucleotidi degenerati per identificare i virus appartenenti al solo genere *Varicellovirus*.

Non sono state individuate altre regioni conservate per l'identificazione contemporanea di virus appartenenti a questo genere analizzando gli allineamenti dei geni codificanti per le glicoproteine B, G ed E.

Regioni per disegno sonde specifiche per ciascun virus. Dall'allineamento delle sequenze codificanti per i diversi geni considerati sono state trovate alcune regioni di omologia a livello di gene UL30, utili per disegnare sonde comuni per identificare contemporaneamente EHV-1 e EHV-4. Sono state inoltre identificate diverse regioni utili per il disegno di sonde specifiche per EHV-1 e per EHV-4. Queste regioni sono a livello di geni UL30, UL27, ORF70, ORF74 e ORF64.

Sono state inoltre selezionate altre porzioni utili per il disegno di sonde per gli altri HV degli equidi, classificati all'interno delle *Alphaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*:

- alcune regioni utili per il disegno di sonde specifiche per EHV-8, a livello di gene ORF70.
- alcune regioni utili per il disegno di sonde specifiche per EHV-9, a livello di geni UL27 e ORF70.
- alcune regioni utili per il disegno di sonde specifiche per EHV-3, a livello di gene UL30.
- alcune regioni utili per il disegno di sonde specifiche per EHV-2, a livello di gene UL30 e UL27.
- alcune regioni utili per il disegno di sonde specifiche per EHV-5, a livello di gene UL30 e UL27
- una regione utile per il disegno di una sonda specifica per AHV-4, a livello di gene UL30.
- una regione utile per il disegno di una sonda specifica per AHV-5, a livello di gene UL30.

Sono state infine selezionate all'interno degli allineamenti UL30, UL27, ORF70 e ORF74 alcune regioni specifiche per altri HV, utili come controlli di specificità. In particolare sono state individuate regioni considerate come controllo per i *Varicellovirus*, per il disegno di sonde comuni per BoHV-1 e BoHV-5, inserendo un certo numero di nucleotidi degenerati, sonde specifiche per BoHV-1, BoHV-5, SuHV-1 e HHV-3. Sono state inoltre selezionate regioni considerate come controllo per le *Betaherpesvirinae*, per il disegno di sonde specifiche per HHV-5 HHV-6 e HHV-7, e

regioni considerate come controllo per le *Gammapherpesvirinae*, per il disegno di sonde specifiche per BoHV-4, OvHV-2 e HHV-8.

Regioni per disegno sonde per ceppi virali di EHV-1. Sono state ricercate solamente le regioni per identificare i ceppi di EHV-1 in quanto la distinzione in ceppi di EHV-4 non è stata ancora definita chiaramente. Per ricercare le regioni utili per il disegno delle sonde per identificare i diversi ceppi di EHV-1 sono state allineate le sequenze complete e le sequenze parziali codificanti corrispondenti alla DNA polimerasi e alla ORF68 disponibili in banca dati.

Le sequenze di UL30 sono state ottenute dai ceppi EHV-1 Ab4 di riferimento (un ceppo neuropatogeno isolato da un caso di malattia con paralisi), EHV-1 V592 (non neuropatogeno isolato da un focolaio di aborti senza disturbi neurologici) e da ceppi di EHV-1 isolati in Europa, Nord e Sud America e in Australia. Dai confronti delle sequenze sono presenti tre siti polimorfici di cui una mutazione puntiforme (presente in posizione 55 dell'allineamento) è stata associata alla severità dei disturbi neurologici descritti nei cavalli [Nugent et al., 2006].

Dall'analisi degli allineamenti degli isolati di EHV-1 per il gene ORF68 si identificano diversi siti polimorfici che si distinguono tra di loro per singole mutazioni puntiformi o diverso numero di residui di nucleotidi in un tratto specifico rispetto alla sequenza di EHV-1 Ab4 di riferimento.

Tuttavia dall'analisi delle sequenze di questi due geni non sono presenti un numero sufficiente di mutazioni per identificare i diversi ceppi di EHV-1 utilizzando sonde lunghe. La distinzione in ceppi sarebbe invece possibile utilizzando sonde corte, che sono attualmente allo studio.

WNV- West Nile virus

Studio del genoma virale di WNV per la scelta delle regioni *target* da sottoporre ad amplificazione

Il WNV è classificato all'interno del genere *Flavivirus* della famiglia *Flaviviridae*. I *Flavivirus* sono distinti in tre gruppi in base alla modalità di trasmissione: *tick-borne viruses*, *mosquito-borne viruses* e virus per i quali non è stato identificato un artropode vettore. I virus appartenenti ai tre gruppi sono ulteriormente divisi in 12 sierogruppi. Il WNV è compreso nel sierogruppo del virus dell'Encefalite Giapponese che include anche i patogeni per l'uomo quali il *Japanese encephalitis virus* (JEV), il *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV), con il ceppo *Alfuy virus* (ALFV), il *St. Louis encephalitis virus* (SLEV) e il *Kunjin Virus* (KUNV), nonché altri virus quali *Cacipacore virus* (CPCV), *Koutango virus* (KOUV), *Usutu virus* (USUV) e *Yaounde virus* (YAOV). Sulla base dell'omologia di sequenza genomica, il *Kunjin virus*, endemico in Australia ed in Asia, è ora considerato un ceppo del WNV [Van Regenmortel et al., 2000].

I virus WNV sono ulteriormente distinti in due linee genetiche: tutti gli isolati di WNV responsabili di epidemie umane appartengono alla linea genetica 1 mentre i virus della linea genetica 2 sono ristretti a infezioni endemiche in Africa e Madagascar e non sono

stati associati a encefaliti nell'uomo. All'interno dei virus appartenenti alla linea genetica 1 si distinguono inoltre tre *cluster* virali: al primo *cluster* appartengono i ceppi di WNV isolati in Africa, Medio Oriente, Europa e Nord America, nel secondo *cluster* sono raggruppati i ceppi di Kunjin virus isolati in Australia e del terzo *cluster* fanno parte i ceppi di WNV isolati in India [Berthet et al., 1997; Scherret et al., 2001]. Recentemente sono stati identificati due virus WNV con caratteristiche genetiche diverse tra loro e diversi tra i WNV fino ad oggi identificati. Per questi nuovi WNV è stata proposta una classificazione di WNV della linea genetica 3 e della linea genetica 4 [Bakonyi et al., 2005].

WNV è un virus costituito da un singolo filamento di RNA a polarità positiva lineare di 11.029 nt. Il genoma è costituito da una breve regione non codificante di 96 nt all'estremità 5' (5'UTR) seguita da una singola ORF di 10.301 nt e da una regione non codificante di 631 nt 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*, le proteine non strutturali NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (polimerasi). Le regioni che codificano per le diverse proteine sono riportate in Fig. 2 [Brinton 2002, modificata]. Tutti i nucleotidi sono numerati secondo le posizioni corrispondenti del ceppo Eg101 di WNV (GenBank AF260968).

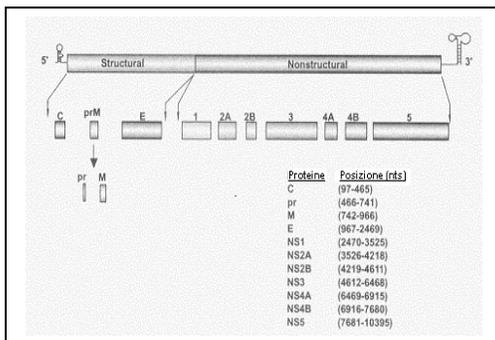


Fig. 2: regioni che codificano per le diverse proteine di WNV [Brinton 2002, modificata]

Secondo quanto riportato in letteratura i *target* maggiormente utilizzati per la diagnosi di WNV mediante PCR e per la caratterizzazione genetica dei diversi ceppi virali sono rappresentati dalle regioni che codificano per la glicoproteina E e per la polimerasi. La proteina E è la più grande proteina strutturale di WNV ed è normalmente glicosilata. È una proteina che gioca presumibilmente un ruolo in numerose attività biologiche che includono l'assemblaggio del virione, l'attacco al recettore cellulare e la fusione dell'*envelope* con le membrane cellulari ed inoltre è la maggiore responsabile dell'induzione della risposta immunitaria protettiva nell'ospite infetto [Monath, 1990]. Recentemente è stato proposto un suo ruolo nella neurovirulenza del virione [Chambers et al., 1998]. Il gene che codifica per la glicoproteina E presenta un regioni con un buon grado di omologia e regioni variabili tra i diversi ceppi di WNV ed è quello che viene normalmente valutato ai fini dell'analisi filogenetica e caratterizzazione delle linee

genetiche di WNV. Inoltre l'analisi della sequenza di questo gene consente di identificare i tre *cluster* virali all'interno dei virus della linea genetica 1 [Berthet et al., 1997 tesi anna]. La distinzione in linee genetiche e *cluster* può essere ottenuta anche mediante l'analisi della sequenza della regione NS5/3'UTR [Scherret et al., 2001]. Il gene che codifica per la polimerasi oltre a presentare differenze tali da distinguere le diverse linee genetiche di WNV è anche la regione maggiormente conservata tra i *Flavivirus*. Il grado di omologia di questo gene è comunque tale da permettere di effettuare analisi filogenetiche tra i *Flavivirus* [Kuno et al., 1998].

Design delle sonde specifiche per WNV per la tecnologia microarray

Sono state inizialmente ricercate le regioni di omologia per il genere *Flavivirus*, le regioni comuni tra i *mosquito-borne viruses* e le regioni specifiche per i virus del gruppo *Japanese encephalitis virus*. Sono state inoltre ricercate le regioni specifiche per virus classificati all'interno di altri gruppi e sierogruppi virali, considerate come controllo di specificità. Sono state inoltre ricercate alcune regioni specifiche per i virus più importanti diversi da WNV classificati all'interno del gruppo dell'encefalite giapponese (controllo di specificità). Successivamente sono state ricercate le regioni comuni e specifiche per tutti i WNV, le regioni per identificare le linee genetiche 1 e 2 di WNV, le regioni variabili per identificare i cluster virali all'interno della linea genetica 1 e per distinguere tra i ceppi virali all'interno dei WNV del primo *cluster* della linea genetica 1 che circolano rispettivamente in Europa (tra i quali sono presenti anche virus Africani geneticamente correlati), in America (e Medio Oriente) e in Africa.

Regioni per disegno sonde per il genere *Flavivirus*. In considerazione dell'elevata variabilità tra i virus appartenenti ai diversi generi della famiglia *Flaviviridae* sono state subito ricercate le regioni di omologia per il solo genere *Flavivirus*. Sono state quindi inizialmente analizzate le sequenze di genoma completo di diversi *Flavivirus* presenti in banca dati. I virus inseriti nell'analisi sono stati selezionati in quanto importanti per l'uomo o per il cavallo e in quanto presenti in ambito europeo. In particolare i *Flavivirus* selezionati sono stati i seguenti:

- *mosquito borne-viruses*:

1. Gruppo *Japanese encephalitis virus*:
 1. *West Nile virus* (WNV)
 1. linea genetica 1
 1. *cluster* Europa-America-Africa-Medio Oriente
 2. *cluster* KUNV
 2. linea genetica 2;
 3. linea genetica 3 (proposta)
 4. linea genetica 4 (proposta)
 2. *Japanese encephalitis virus* (JEV)
 3. *Murray valley encephalitis virus* (MVEV) e ceppo Alfuy virus (ALFV)
 4. *St. Louis encephalitis virus* (SLEV)
 5. *Usutu virus* (USUV), ceppo di referenza e diversi ceppi
2. Gruppo *Yellow fever virus*:

1. *Yellow fever virus* (YFV), diversi ceppi
3. Gruppo *Dengue virus*:
 1. *Dengue virus* (DEN)
 1. DEN-1,
 2. DEN-2,
 3. DEN-3,
 4. DEN-4
- *Tick-borne viruses*:
 1. Gruppo *Mammalian tick-borne virus*
 1. *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV)
 2. *Louping ill virus* (LIV)
- Virus per i quali non è riconosciuto un artropode vettore
 1. Gruppo *Modoc virus*
 1. *Modoc virus* (MODV)
 2. Gruppo *Rio Bravo virus*
 1. *Rio Bravo virus* (RBV)

Sono state inizialmente ricercate le regioni comuni tra i diversi *Flavivirus* utilizzando un programma per identificare le regioni conservate tra genomi completi diversi [<http://pegasus.caspu.it/CSTminer>]. Il risultato di quest'analisi preliminare ha evidenziato che l'unica regione parzialmente conservata tra tutti i *Flavivirus* è localizzata a livello di NS5-3'UTR, come di fatto già riportato in letteratura. Sono state quindi allineate le sequenze delle regioni NS5-3'UTR dei diversi *Flavivirus* in elenco. Dall'analisi delle sequenze non è stata trovata una regione di circa 100 nt di omologia tra i diversi *Flavivirus* utile per disegnare sonde lunghe. Sono state invece identificate una/due regioni di omologia meno ampie (circa 15 nt) a livello di regione che codifica per la NS5 che potrebbero essere utili per il disegno di sonde corte per questa famiglia e altrettante regioni per il disegno di sonde corte comuni tra i *tick-borne viruses* e i *mosquito-borne viruses*. Queste sonde sono attualmente allo studio.

Regioni per disegno sonde per il gruppo virale basato sulla modalità di trasmissione. Per la ricerca delle regioni conservate su cui disegnare le sonde sono state analizzate le sequenze allineate della regione NS5-3'UTR dei *Flavivirus* riportati sopra. Anche in questo caso non è stata individuata una regione di circa 100 nt di omologia specifica per i *mosquito-borne viruses* o virus per i quali non è stato identificato un artropode vettore. È stata invece identificate una regione di omologia meno ampia (circa 20 nt), a livello di regione 3'UTR, che potrebbe essere utile per il disegno di sonde corte comuni per i *mosquito-borne viruses* e che è attualmente allo studio. Dall'analisi delle sequenze sono state invece identificate alcune regioni utili per il disegno di sonde per i *tick-borne viruses*, considerate come controllo di specificità. Più precisamente queste ultime sonde sono disegnate su regioni di omologia tra il *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) e il *Louping ill virus* (LIV).

Regioni per disegno sonde per il sierogruppo virale. Per la ricerca delle regioni su cui disegnare le sonde comuni per il sierogruppo *Japanese encephalitis virus* sono state analizzate le sequenze allineate della regione NS5-3'UTR dei *Flavivirus* classificati all'interno di questo sierogruppo, aggiungendo anche le uniche sequenze disponibili (regioni NS5) di *Yaounde virus*, *Cacipacore virus* e *Koutango virus*, classificati all'interno di questo sierogruppo. Non è stata individuata una regione di omologia sufficientemente ampia specifica per i virus di questo sierogruppo. Sono state invece identificate diverse regioni di omologia meno ampie (circa 20 nt) per questi virus classificati all'interno della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* che potrebbero essere utili per il disegno di sonde corte per questa sottofamiglia e che sono attualmente allo studio.

Regioni per disegno sonde per la specie virale. Per la ricerca delle regioni su cui disegnare le diverse sonde per WNV sono stati allineati tutti i ceppi principali di WNV per i quali è disponibile il genoma completo o la poliproteina e tutte le sequenze principali di WNV disponibili in banca dati per le regioni che codificano per la glicoproteina E. Dall'analisi delle sequenze di WNV è stata identificata un'unica regione comune tra tutti i WNV (linea genetica 1, 2, 3 e 4) con genoma completo, localizzata a livello della regione che codifica per la NS2A, utile per disegnare sonde con diversi nucleotidi degenerati per la specie WNV.

Sono state successivamente selezionate alcune regioni specifiche per gli altri *Flavivirus*, all'interno degli allineamenti della regione NS5-3'UTR, utili come controlli di specificità. In particolare sono state individuate regioni per disegnare sonde specifiche per *Japanese encephalitis virus* (JEV) e *Usutu virus* (USUV), considerate come controllo per questi virus del sierogruppo *Japanese encephalitis virus*. Particolare importanza è stata data alle regioni per disegnare le sonde per USUV, in considerazione della circolazione di questo virus in Europa, anche se riportato nelle popolazioni di volatili e non negli equini [Weissenböck et al., 2002].

Si è quindi proceduto con l'identificazione di alcune regioni per disegnare sonde specifiche per *Yellow fever virus* (YFV), DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4, considerate come controllo di specificità per i virus principali classificati all'interno dei due gruppi *Yellow fever virus* e *Dengue virus* dei *mosquito-borne viruses*.

Sono state infine identificate alcune regioni, considerate come controlli di specificità, per identificare i virus principali classificati all'interno dei due gruppi virali *tick-borne viruses* e virus per i quali non è stato identificato un artropode vettore. Più precisamente è stata individuata una regione su cui disegnare sonde per TBEV e sonde per LIV (*tick-borne viruses*). Inoltre sono state identificate alcune regioni su cui disegnare sonde specifiche per *Modoc virus* e per *Rio Bravo virus* (virus per i quali non è stato identificato un artropode vettore).

Regioni per disegno sonde per la linea genetica di WNV. Per la ricerca di queste regioni sono stati utilizzati gli allineamenti delle sequenze di tutti i ceppi principali di WNV per i quali è disponibile il genoma completo o la poliproteina e tutte le sequenze principali di WNV disponibili in banca dati per le regioni che codificano per la glicoproteina E.

Sono state identificate due regioni conservate a livello della regione NS5-3'UTR su cui disegnare le sonde per identificare contemporaneamente i WNV della linea genetica 1 e 2.

Dall'analisi delle sequenze non sono state invece identificate regioni conservate sufficientemente ampie tra i WNV dei *cluster* della linea genetica 1 e pertanto non è stato possibile disegnare sonde per tutti i WNV della linea genetica 1. Sono state invece identificate alcune regioni per disegnare sonde specifiche per ciascuna delle altre linee genetiche (linea genetica 2, 3 e 4), considerate come controllo di specificità. Inoltre sono state identificate numerose regioni di omologia meno ampie (20-40 nt) a livello di tutto il genoma che potrebbero essere utili per il disegno di sonde corte per i WNV della linea genetica 1 e che sono attualmente allo studio.

Regioni per disegno sonde per i *cluster* di WNV della linea genetica 1. Per la ricerca di questa regione sono state considerate le sequenze dei ceppi di WNV che circolano in Africa, Europa, America e Medio Oriente (primo *cluster*) e quelle di *Kunjin virus* (KUNV) endemico in Australia (secondo *cluster*). Non è stato possibile includere nell'analisi le sequenze dei ceppi di WNV che circolano in India (terzo *cluster*) in quanto le sequenze disponibili in banca dati erano scarse e si riferivano a corte sequenze di regioni poco rappresentate per gli altri ceppi di WNV più importanti. Sono state identificate diverse regioni, a livello di gene che codifica per la glicoproteina E e di regione NS5/3'UTR, per disegnare sonde per il *cluster* di WNV della linea genetica 1 che circolano in Africa, Europa, America e Medio Oriente. Sono state inoltre identificate alcune regioni, sempre a livello di gene che codifica per la glicoproteina E e di regione NS5/3'UTR, per disegnare sonde per il *cluster* di WNV della linea genetica 1 che circolano in Australia (KUNV), considerate come controllo di specificità.

Regioni per disegno sonde per i ceppi virali all'interno dei WNV del primo *cluster* della linea genetica 1. Dall'analisi degli allineamenti è stata osservata una differenza di sequenza tra i ceppi di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1 che circolano in Europa (tra i quali sono presenti anche virus Africani geneticamente correlati), in America (e Medio Oriente) e in Africa. Per questioni di semplicità questi ceppi sono stati denominati rispettivamente ceppi europei, ceppi americani e ceppi africani. Sono state identificate diverse regioni per disegnare sonde per i ceppi europei di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1. Queste sono a livello di geni che codificano per la glicoproteina E, per la proteina NS1, e per NS5. Si è cercato inoltre di distinguere tra ceppi virali che circolano o che hanno circolato in Francia e in Italia (e virus Africani geneticamente correlati) e ceppi dell'est Europa. È stata identificata una regione (a livello di gene che codifica per la proteina NS2A) per il disegno di sonde per i virus che circolano nei Paesi dell'est all'interno dei ceppi europei di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1. Non è stato possibile identificare una regione specifica sufficientemente ampia per i ceppi europei che circolano o che hanno circolato in Italia e Francia. La distinzione di questi ceppi sarebbe invece possibile utilizzando sonde corte, che sono attualmente allo studio.

Sono state identificate diverse regioni su cui disegnare sonde per i ceppi americani di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1. Queste regioni sono a livello di geni che codificano per la glicoproteina E, per la proteina NS2A e per la NS5.

Infine, sono state identificate diverse regioni su cui disegnare sonde per i ceppi africani di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1. Queste regioni sono a livello di geni che codificano per la glicoproteina E, per la proteina NS2A e per la NS5.

BDV- *Bornavirus*

Studio del genoma virale di BDV per la scelta delle regioni *target* da sottoporre ad amplificazione

Il BDV presenta diverse caratteristiche tipiche. L'organizzazione del genoma e le sequenze nucleotidiche sono simili a quelle degli altri membri dell'Ordine dei *Mononegavirales*. In considerazione della replicazione e della trascrizione a livello nucleare, pur essendo un virus a RNA, dell'elevata omologia di sequenza e dell'ampio spettro d'ospite, il BDV è classificato come unico virus all'interno dell'unico genere *Bornavirus* della famiglia *Bornaviridae* [Kolodziejek et al., 2005].

I ceppi di laboratorio di BDV fino ad oggi noti (ceppo V, He/80, H1766, RW98 e ceppo vaccinale Dessau) presentano un elevato grado di omologia. Sono tutti virus che sono stati originariamente isolati da equini provenienti da aree endemiche, tra le quali soprattutto la Germania. A livello europeo, oltre alla Germania, il virus è endemico anche in Svizzera, Liechtenstein e Austria. Recentemente però è stato identificato un ceppo di BDV austriaco, denominato No/98, che presenta una sequenza del genoma diversa da tutti gli altri ceppi di BDV [Nowotny et al., 2000].

Kolodziejek e collaboratori hanno inoltre recentemente riportato la distinzione in gruppi genetici di BDV sulla base dell'origine geografica. Sono stati identificati ceppi tedeschi che circolano solamente in Baviera (simili al ceppo RW98), ceppi tedeschi che circolano in Baviera e Baden-Württemberg (simili al ceppo He/80), ceppi tedeschi che circolano nelle aree meridionali della Sassonia-Anhalt e zone confinanti settentrionali della Sassonia (simili al ceppo vaccinale Dessau), ceppi tedeschi che circolano in diverse regioni federali tra le quali soprattutto Turingia e Bassa Sassonia (simili ai ceppi V e H1766), e ceppi svizzeri, del Liechtenstein e ceppi austriaci [Kolodziejek et al., 2005].

Il BDV è un virus a RNA a unico filamento, non segmentato, a polarità negativa (NNS RNA virus) di circa 8.910 nt. L'RNA del BDV contiene 6 ORFs che codificano per 6 proteine: la nucleoproteina p40/p38 (proteina N), la fosfoproteina p24/p16 (proteina P), la proteina di matrice gp18 (proteina M), la glicoproteina dell'*envelope* gp94 (proteina G), la RNA polimerasi RNA dipendente p190 (proteina L) e la sesta proteina recentemente descritta e denominata proteina X o p10 [Kolodziejek et al., 2005]. Le regioni che codificano per le diverse proteine sono riportate in Fig. 3 [Kolodziejek et al., 2005, modificata]. Tutti i nucleotidi sono numerati secondo le posizioni corrispondenti del BDV di riferimento, ceppo V (GenBank U04608).

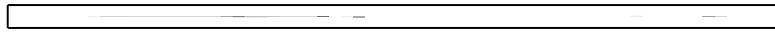


Fig. 3: BDV: ORF che codificano per le diverse proteine: 1 (nucleoproteina), 2 (fosfoproteina), 3 (proteina di matrice), 4 (glicoproteina dell'envelope), 5 (RNA polimerasi RNA dipendente) e 6 (proteina X) [Kolodziejek et al., 2005, modificata].

I *target* maggiormente utilizzati per la diagnosi di BDV mediante PCR e per la caratterizzazione genetica dei *Bornavirus* sono rappresentati dalle regioni che codificano per la nucleoproteina (p40, proteina N) e per la fosfoproteina (p24, proteina P) [Kolodziejek et al., 2005; Hilbe et al., 2006; Berg et al., 2001; Schindler et al., 2006].

Le proteine N, P e L costituiscono il complesso della polimerasi virale, la cui funzione è regolata negativamente dalla piccola proteina regolatoria p10 [Tomonaga et al., 2002]. La nucleoproteina N in particolare sembra svolgere un ruolo importante nel trasporto a livello nucleare del complesso ribonucleoproteico (RNP), in quanto si lega ad altre proteine virali, tra le quali la fosfoproteina P, ed è probabilmente una componente essenziale del complesso RNP stesso. Recentemente è stata dimostrata anche una sua attività nel trasporto del complesso RNP dal nucleo verso il citoplasma. La nucleoproteina presenta due isoforme con peso molecolare di 40 e 38 kDa (p40 e p38). Le differenze funzionali tra le due isoforme non sono del tutto note ma il segnale di localizzazione nucleare è presente solamente nell'isoforma p40. Anche la fosfoproteina P presenta un segnale di localizzazione nucleare e svolgerebbe la funzione di cofattore essenziale della polimerasi virale, come riportato per tutte le fosfoproteine dei NNS RNA virus. Questa proteina svolge probabilmente un ruolo importante nel trasporto nucleare del complesso RNP in associazione alla proteina N. Recentemente è stato dimostrato che si lega anche alla proteina p10 e questo legame sembra essere alla base della regolazione negativa dell'attività di replicazione virale svolta dalla stessa proteina p10. Infine, l'ORF che codifica per la proteina P codifica anche per una piccola proteina di 16 kDa, denominata P', la cui funzione è sconosciuta ma sembra essere diversa dall'attività della proteina P [Tomonaga et al., 2002].

Design delle sonde specifiche per BDV per la tecnologia microarray

Sono state ricercate le seguenti regioni per disegnare le sonde specifiche: regioni conservate per la famiglia *Bornaviridae* e genere *Bornavirus*, e alcune regioni variabili e specifiche per la caratterizzazione dei cluster genetici di BDV in base all'origine geografica.

Regioni per disegno sonde per il genere *Bornavirus*. In considerazione del fatto che il genere *Bornavirus* è l'unico classificato all'interno della famiglia *Bornaviridae*, sono state subito ricercate le regioni conservate per questo genere virale. Per la ricerca di queste regioni sono stati allineati tutti i ceppi di BDV con genoma completo (ceppo V, He/80, H1766, No/98) e tutte le sequenze di BDV disponibili in banca dati per le ORF che codificano per la p40 e la p24.

Dall'analisi delle sequenze sono state identificate alcune regioni sufficientemente conservate tra tutti i ceppi di BDV con genoma completo, localizzate a livello della ORF che codifica per la p40, la p24, proteina M e la proteina G. Queste regioni sono state quindi utilizzate per il disegno delle sonde specifiche per il genere *Bornavirus*, con nucleotidi degenerati.

Nelle rimanenti regioni del genoma il ceppo BDV No/98 risulta completamente diverso da tutti gli altri ceppi di BDV e quindi è stato ricercato separatamente. Per tutti gli altri ceppi di BDV sono state identificate diverse e numerose regioni conservate, lungo tutto il genoma completo, su cui disegnare le sonde per BDV diversi da No/98. Tra queste regioni sono state selezionate anche alcune sequenze specifiche del ceppo No/98, per disegnare le sonde per il solo BDV No/98.

Regioni per disegno sonde per i cluster virali di BDV in base all'origine geografica.

Per la ricerca di queste regioni sono state allineate tutte le sequenze di BDV disponibili in banca dati delle sequenze che codificano per la p24 e per la p40. Dall'analisi dell'allineamento sono state identificate le seguenti regioni su cui disegnare sonde specifiche per i cluster virali:

- una regione, a livello della ORF che codifica per la p40, che identifica i ceppi tedeschi che circolano in Baviera (simili al ceppo RW98), utile per il disegno di sonde per i ceppi della Baviera;
- una regione, a livello della ORF che codifica per la p40, che identifica i ceppi tedeschi che circolano in Baviera e nella Baden-Württemberg (simili al ceppo He/80), utile per il disegno di sonde per i ceppi della Baviera e della Baden-Württemberg;
- alcune regioni, a livello delle ORF che codificano per la p40 e p24, che identificano i ceppi tedeschi che circolano in Sassonia-Anhalt e zone confinanti settentrionali della Sassonia (simili al ceppo vaccinale Dessau), utile per il disegno di sonde per i ceppi della Sassonia-Anhalt e Sassonia;
- una regione, a livello della ORF che codifica per la p40, che identifica i ceppi tedeschi che circolano soprattutto nelle aree della Turingia e Bassa Sassonia (simili al ceppo V e H1766), utile per il disegno di sonde per i ceppi della Turingia e Bassa Sassonia;
- alcune regioni, a livello delle ORF che codificano per la p40 e p24, che identificano i ceppi svizzeri, del Liechtenstein e ceppi austriaci, utile per il disegno di sonde per i ceppi non tedeschi.

DESIGN DELLE SONDE SPECIFICHE PER TECNOLOGIA MICROARRAY

Il completamento di questa fase ha previsto il disegno delle sonde specifiche per la tecnologia *microarray* per l'identificazione di *Equid herpesvirus 1* (EHV-1), *Equid herpesvirus* (EHV-4), *West Nile virus* (WNV) e *Borna disease virus* (BDV).

L'analisi delle regioni da noi selezionate ha messo in evidenza in diverse situazioni alcune problematiche legate all'utilizzo di sonde lunghe. Queste sonde infatti non sembrerebbero consentire l'identificazione dei diversi ceppi virali nell'ambito della specie virale (genotipizzazione), in quanto alcuni virus si distinguono tra di loro per la presenza di una variazione di uno o pochi siti nucleotidici, non rilevabili con questi tipi di sonde. Sulla base delle sequenze disponibili non è inoltre possibile ovviare a questo problema selezionando diversi e numerosi geni *target* da identificare con le sonde lunghe in quanto la distinzione in ceppi virali è normalmente dovuta a variazioni di un gene singolo, a seguito di singole mutazioni puntiformi. In questi casi il *microarray* dovrebbe essere costituito necessariamente da sonde corte al fine di garantire la specificità richiesta [Bodrossy et al., 2003; Stralis-Pavese et al., 2004; Kostic et al., 2005; Loy & Bodrossy, 2006]. Inoltre lungo le regioni non sono presenti sequenze omologhe sufficientemente ampie per identificare con le sonde lunghe alcune sottofamiglie, generi, sierogruppi, o linee genetiche virali. In qualche caso tale identificazione sarebbe possibile solo utilizzando sonde lunghe con diverse e numerose posizioni di degenerazione. L'ampiezza delle sequenze omologhe presenti sulle regioni selezionate sarebbe invece sufficiente per l'identificazione mediante sonde corte.

In considerazione di questi aspetti e della finalità diagnostica della tecnologia *microarray*, utile anche ai fini di una genotipizzazione, si è quindi scelto l'utilizzo delle sonde corte che però non sono molto adatte a identificare nuovi virus (“*viral discovery*”). Tale problema può essere in parte risolto utilizzando sonde corte in grado di identificare i generi virali o i sierogruppi e dal successivo sequenziamento dei campioni che “sfuggono” all'identificazione a livello di specie virale.

Per aumentare la sensibilità e la specificità della tecnologia *microarray* le regioni *target* verranno amplificate mediante PCR o RT-PCR, tappa necessaria e prevista anche per i *microarray* costituiti da sonde lunghe. In particolare, in base ai dati di letteratura, sono state selezionate metodiche di PCR o RT-PCR che utilizzano *primer* universali per gli *Herpesvirus*, i *Flavivirus* e i *Bornavirus* [Rose, 2005; Scaramozzino et al., 2001; Pierre et al., 1994; Kolodziejek et al., 2005]. Inoltre è stata messa a punto una metodica di PCR per i virus erpetici degli equidi appartenenti al genere *Varicellovirus* (EHV-1, EHV-4, EHV-8, EHV-9). Sono state infine selezionate RT-PCR specie-specifiche per il virus WNV [Berthet et al., 1997; Deubel et al., 1993], PCR specie-specifiche messe a punto dall'Unità Operativa 1 per EHV-1/EHV-4 e per BDV, mentre la nostra Unità Operativa ha messo a punto una PCR specie-specifica per EHV-1. Le regioni utili per il disegno delle sonde sono state quindi ulteriormente esaminate e sono state selezionate solo quelle comprese all'interno di sequenze amplificate mediante le strategie di PCR o RT-PCR appena descritte (vedi dopo).

Le regioni sono state ulteriormente analizzate mediante programma per il disegno delle sonde (Primer3, http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), che ci ha consentito di disegnare sonde di circa 20-mer, con temperatura di *melting* di circa 60°C (omogeneità di ibridazione). Non è stato invece possibile utilizzare il programma specifico per il disegno delle sonde OligoWiz 2, come inizialmente considerato, in quanto non dispone di un database di sequenze virali. Nel caso di regioni con corte sequenze di omologia, le sonde sono state disegnate manualmente e non è stato sempre possibile rispettare la stessa temperatura di *melting*.

Sono stati successivamente valutati alcuni parametri per ogni sonda, quali la percentuale in GC, la sensibilità, attraverso l'analisi delle possibili strutture secondarie (*hairpin*, self-dimeri), e la specificità, utilizzando specifici strumenti bioinformatici (Integrated DNA Technologies-IDT-, <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>; Blast). Sono state infine selezionate le sonde con *score* migliore, soprattutto in termini di sensibilità e specificità.

In considerazione degli elevati costi delle sonde, solo in base ai risultati che si otterranno con le sonde attualmente inserite in allegato 1, si potrà valutare la possibilità di utilizzare tutte le sonde *reverse complement*, altre sonde già disegnate ma con *score* inferiore, alcune sonde di letteratura specifiche per EHV-1, EHV-4, WNV e BDV, e altre sonde già disegnate come controllo di specificità.

EHV-1 e EHV-4- *Equid herpesvirus-1* e *Equid herpesvirus-4*

Le sonde sono state disegnate all'interno delle regioni amplificate mediante strategie di *semi-nested* PCR riportate in letteratura oppure messe a punto dalla Unità Operativa 1 o da noi. La strategia di *semi-nested* PCR di letteratura è basata sull'utilizzo di *primer* universali per tutti gli HV a livello di gene che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi [Rose, 2005]. Le metodiche di *semi-nested* PCR messe a punto dalla nostra Unità Operativa sono invece specifiche per i virus erpetici equini, genere *Varicellovirus* (EHV-1, EHV-4, EHV-8, EHV-9) e per il solo EHV-1 e sono relative all'amplificazione di porzioni di geni che codificano rispettivamente per la glicoproteina G e per la glicoproteina B. Per l'amplificazione del gene che codifica per la glicoproteina E è stata considerata la PCR messa a punto dalla Unità Operativa 1. Tali metodiche sono riportate in dettaglio nella fase 1N (preparazione del campione).

Le sonde disegnate sono in grado di rilevare gli HV appartenenti alle sottofamiglie *Alpha-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*, al genere *Varicellovirus*, e di arrivare all'identificazione della specie e delle varianti di patogenicità di EHV-1. L'elenco e le principali caratteristiche delle sonde sono riportate in allegato 1, mentre di seguito vengono descritte le caratteristiche delle sonde ai fini diagnostici.

Sonde per le sottofamiglie *Alpha-*, *Beta-* e *Gammaherpesvirinae*. In considerazione della variabilità degli HV in relazione ai geni analizzati, non è stato possibile disegnare una sonda corta conservata per la famiglia *Herpesviridae* nel suo complesso.

Pertanto si è proceduto nel tentativo di identificare le singole sottofamiglie virali. Dall'analisi degli allineamenti dei virus classificati all'interno della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* non è stato possibile disegnare sonde corte non degenerate per questa sottofamiglia. Anche per quanto riguarda i *Betaherpesvirus*, non sono state individuate delle regioni di omologia utili per identificare contemporaneamente HHV-5, HHV-6 e HHV-7.

È stata invece disegnata una sonda, a livello del gene che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi, con caratteristiche che la rendono un potenziale buon

controllo di specificità per l'identificazione dei soli virus equini e asinini (EHV-2, EHV-5, AHV-4, AHV-5) appartenenti alla sottofamiglia *Gammaherpesvirinae*:

- HV_g_eq_DNAp_4_1

Sonde per il genere *Varicellovirus*. È stata individuata una regione con elevato grado di omologia, a livello di gene che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi, su cui sono state disegnate due sonde (di cui la prima con due nucleotidi degenerati per poter identificare anche il FeHV) specifica per tutti i virus di interesse veterinario appartenenti al genere *Varicellovirus*:

- HV_a_varvetcat__DNAp_1_1 (EHV-1, EHV-4, SuHV-1, BoHv-1, BoHV-5, FeHV)
- HV_a_varvet__DNAp_1_1 (EHV-1, EHV-4, SuHV-1, BoHv-1, BoHV-5)

Inoltre è stata disegnata una sonda per i *Varicellovirus degli equini* (EHV-1, EHV-4, EHV-8, EHV-9, con esclusione di EHV3) a livello di gene che codifica per la glicoproteina G :

- HV_a_var_eq_gG_3_1

Sonde specie-specifiche. Sono state disegnate due sonde comuni (con un nucleotide degenerato), a livello di gene che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi, per identificare contemporaneamente **EHV-1 e EHV-4**:

- EHV1-4_DNAp_6_1(20)
- EHV1-4_DNAp_6_2

Sono state inoltre disegnate diverse sonde specifiche per **EHV-1** e per **EHV-4**. Queste sonde ibridano a livello di geni che codificano per la subunità catalitica della DNA polimerasi, per la glicoproteina G, per la glicoproteina E (che corrisponde alla regione in cui è stata disegnata la sonda utilizzata per la Real Time PCR messa a punto dalla Unità Operativa 1) e nel caso di EHV-1 anche per la glicoproteina B.

Le sonde disegnate per EHV-1 sono rappresentate da:

- EHV1_DNAp_2_3
- EHV1_DNAp_3_1
- EHV1_DNAp_3_2
- EHV1_gG_1_2
- EHV1_gG_1_1
- EHV1_gE_1_1
- EHV1_gB_1_2
- EHV1_gB_2_1

Le sonde disegnate per EHV-4 sono rappresentate da:

- EHV4_DNAp_2_2
- EHV4_DNAp_2_3
- EHV4_DNAp_3_3
- EHV4_gG_1_5

- EHV4_gG_2_1
- EHV4_gE_1_1

Sono state inoltre disegnate sonde per gli **altri HV degli equidi**, appartenenti alle *Alphaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, utili come controllo di specificità (una sonda per ciascun virus, ad eccezione di due sonde per EHV-2):

- EHV-8 (a livello di glicoproteina G): EHV8_gG_3_1
- EHV-9 (a livello di glicoproteina G): EHV9_gG_1_2
- EHV-3 (a livello di subunità catalitica della DNA polimerasi): EHV3_DNAp_3_5
- EHV-2 (a livello di subunità catalitica della DNA polimerasi): EHV2_DNAp_3_1; EHV2_DNAp_5_1
- EHV-5 (a livello di subunità catalitica della DNA polimerasi): EHV5_DNAp_5_1
- AHV-4 (a livello di subunità catalitica della DNA polimerasi): AHV4_DNAp_3_1
- AHV-5 (a livello di subunità catalitica della DNA polimerasi): AHV5_DNAp_3_1

Sono state infine disegnate alcune sonde specifiche per altri HV, utili come controlli di specificità. In particolare sono state disegnate due sonde sulla regione che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi considerate come controllo per i *Varicellovirus non degli equidi*:

- sonda comune per BoHV-1 e BoHV-5: BoHV1,5_DNAp_2_1,
- SuHV-1: SuHV-1_DNAp_3_1

Sonde per ceppi virali EHV-1 ed EHV-4. Sono state disegnate le sonde per identificare i **ceppi neuropatogeni e non neuropatogeni di EHV-1**, caratterizzati da una singola mutazione puntiforme a livello del gene che codifica per la subunità catalitica della DNA polimerasi, riportata da Nugent e collaboratori:

- EHV1neur_DNAp_4_2A
- EHV1nonneur_DNAp_4_2B

Inoltre sono state osservate, a livello di geni che codificano per le glicoproteina G e B, lievi differenze di sequenza tra i ceppi di EHV-1 tipici dei cavalli (definiti h) rispetto a quelli identificati in altre specie di equidi domestici e selvatici (definiti nh). È stato quindi possibile disegnare le sonde per distinguere i **ceppi di EHV-1 tipici dei cavalli da quelli isolati da altre specie**, basate su una singola mutazione puntiforme:

- EHV1h_gB_1_3a
- EHV1hn_gB_1_3b
- EHV1_gG_1_4a
- EHV1nh_gG_1_4b

Infine a livello di gene che codifica per la glicoproteina G è stata osservata una differenza di sequenza tra il ceppo di riferimento dell'EHV-4 (ceppo 1942 e tutti gli altri EHV-4, definiti ns) e il 405/76 (definito nns). Sono quindi state disegnate due sonde per discriminare **il ceppo 405-76 di EHV-4 dagli altri ceppi di EHV-4:**

- EHV4nns_gG_3_1b
- EHV4ns_gG_5_1a

WNV- West Nile virus

Le sonde sono state disegnate all'interno delle regioni amplificate mediante strategie di *semi-nested* RT-PCR o RT-PCR riportate in letteratura o messe a punto dalla Unità Operativa 1. La strategia di *semi-nested* RT-PCR di letteratura è basata sull'utilizzo di *primer* universali per tutti i *Flavivirus* che amplificano il gene della polimerasi NS5 [Rose, 2005]. Le metodiche di RT-PCR di letteratura sono caratterizzate dall'utilizzo di *primer* universali per i *mosquito-borne Flavivirus* che amplificano una porzione di geni che codificano per la NS5 e per le regione 3'UTR [Pierre et al., 1994] oppure da *primer* che amplificano una porzione del gene della glicoproteina E [Berthet et al., 1997; Deubel et al., 1993]. Tali metodiche sono riportate in dettaglio nella fase 1N (preparazione del campione).

Sono state disegnate le sonde in grado di rilevare il genere *Flavivirus*, e, all'interno di questo il gruppo *mosquito-borne viruses*, fino ad arrivare al sierogruppo *Japanese encephalitis virus*. Sono state anche disegnate le sonde per virus classificati all'interno di altri gruppi e sierogruppi virali, considerate come controllo di specificità. Inoltre, sono state disegnate altre sonde per i più importanti virus diversi da WNV, appartenenti al sierogruppo dell'encefalite giapponese (controllo di specificità). Successivamente sono state disegnate sonde comuni e altre specifiche che discriminano l'uno dall'altro le linee genetiche 1 e 2 di WNV, i *cluster* virali all'interno della linea genetica 1 e i ceppi virali all'interno dei WNV del primo *cluster* della linea genetica 1, che circolano rispettivamente in Europa (tra i quali sono presenti anche virus Africani geneticamente correlati), in America (e Medio Oriente) e in Africa. L'elenco e le principali caratteristiche delle sonde sono riportate in allegato 1, mentre di seguito vengono descritte le caratteristiche delle sonde ai fini diagnostici.

Sonde per il genere *Flavivirus*. È stata identificata una regione conservata molto corta che codifica per la NS5 su cui è stata disegnata una sonda con diversi nucleotidi degenerati per identificare tutti i virus del genere *Flavivirus*:

- Flavi_gen_NS5_1_1

Sonde per il gruppo *mosquito-borne viruses*. L'unica zona di omologia è a livello di regione 3'UTR e coincide con la zona sulla quale è stato disegnato uno dei *primer* di letteratura di Pierre e collaboratori. Per non perdere questa informazione diagnostica è stata comunque disegnata una sonda corta comune per i *mosquito-borne viruses* in questa posizione:

- Flavi_mosq_NS5-3UTR_1_1

Sono state disegnate alcune sonde specifiche per la regione NS5 dei *tick-borne viruses*, considerate come controllo di specificità. Più precisamente, queste sono specifiche per *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) e *Louping ill virus* (LIV):

- TBEV_NS5_1_1
- LIV_NS5_1_1

Inoltre sono state disegnate sulla regione NS5 due sonde specifiche per *Modoc virus* e per *Rio Bravo virus*, considerate come controllo di specificità in quanto identificano il terzo raggruppamento di virus secondo la modalità di trasmissione (virus per i quali non è stato identificato un artropode vettore):

- Mod_NS5_1_1
- RioB_NS5_1_2

Regioni per disegno sonde per il sierogruppo virale. Sono state disegnate due sonde per i virus del sierogruppo *Japanese encephalitis virus* a livello di regione NS5-3'UTR, la seconda della quali però non è in grado di identificare il virus Leiv-Krnd88-190 (WNV della linea genetica 4 proposta):

- Flavi_seruJEV_NS5-3UTR_1_1
- Flavi_seruJEV_NS5-3UTR_3_1 (non identifica il virus Leiv-Krnd88-190)

Inoltre, sempre a livello di regione NS5-3'UTR, è stata disegnata una sonda comune tra i virus WNV e JEV:

- Flavi_JEV,WNV_NS5-3UTR_1_1

A livello delle regioni NS5 e NS5-3'UTR sono state disegnate alcune sonde specifiche per *Flavivirus* classificati all'interno di altri sierogruppi, considerati come controllo di specificità. In particolare sono state disegnate le sonde per YFV (sierogruppo *Yellow fever virus*) e DENV (sierogruppo *Dengue virus*). In considerazione dell'estrema variabilità tra i *Dengue virus* non è stato possibile disegnare una sonda comune con *score* accettabile per tutti i DENV, pertanto è stata disegnata una sonda comprensiva di DENV-1, DENV-2, DENV-3 e un'altra che invece identifica DENV-4:

- DEN_1,2,3_NS5-3UTR_1_1
- DEN4_NS5_1_1
- YFV_NS5-3UTR_1_1

Sonde specie-specifiche. Non è stato possibile identificare, all'interno delle regioni citate dalla letteratura, una sequenza con omologia adeguata a disegnare una sonda comune per i WNV di tutte le linee genetiche sinora individuate (linea genetica 1, 2, oltre alle linee genetiche 3 e 4 proposte). Sono state invece disegnate tre sonde comuni per i WNV della linea genetica 1 e 2 a livello di regione NS5-3'UTR (le ultime due sonde corrispondono alla regione su cui è stata disegnata la sonda per la Real Time PCR messa a punto dalla Unità Operativa 1):

- WNV_1,2_NS5-3UTR_1_1
- WNV_1,2_NS5-3UTR_2_1
- WNV_1,2_NS5-3UTR_2_2

Sono state disegnate a livello di regione NS5 e NS5-3'UTR sonde specifiche per gli altri virus del sierogruppo *Japanese encephalitis virus*, considerate come controllo di specificità:

- JEV_NS5_2_1
- USU_NS5_1_1
- USU_NS5-3UTR_3_1

Sonde per le diverse linee genetiche di WNV. Sono state disegnate due sonde specifiche per tutti i WNV della linea genetica 1 a livello di regione NS5 e NS5-3'UTR:

- WNV_1_all_NS5_2_1
- WNV_1_all_NS5-3UTR_3_1

Sono state disegnate sonde specifiche per i virus della linea genetica 2 , 3 e 4 a livello di regione NS5-3'UTR e della glicoproteina E, considerate come controllo di specificità:

- WNV_2_NS5-3UTR_1_1
- WNV_2_gE_1_1
- Rab_gE_1_1 (WNV linea genetica 3 proposta)
- Leiv_gE_1_1 (WNV linea genetica 4 proposta)

Sonde per i cluster di WNV della linea genetica 1. Sono state disegnate diverse sonde, a livello di gene della glicoproteina E e della regione NS5/3'UTR, per il *cluster* di WNV della linea genetica 1 che circolano in Africa, Europa, America e Medio Oriente.

- WNV_1a_NS5-3UTR_1_1
- WNV_1a_NS5-3UTR_4_1
- WNV_1a_gE_1_1
- WNV_1a_gE_3_1

Sono state inoltre disegnate, a livello del gene della glicoproteina E e della regione NS5/3'UTR, sonde per il *cluster* di WNV della linea genetica 1 che circolano in Australia (KUNV, *cluster* b) e in India (*cluster* c), considerate come controllo di specificità:

- WNV_1b_NS5-3UTR_2_1b
- WNV_1c_gE_2_1

Sonde per i ceppi virali compresi nel primo cluster della linea genetica 1.

Dall'analisi degli allineamenti sono state osservate differenze di sequenza tra i ceppi di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1 che circolano in Europa (tra i quali sono presenti anche virus Africani geneticamente correlati), in America (e Medio Oriente) e in Africa. Per questioni di semplicità questi ceppi sono stati denominati rispettivamente ceppi europei (E), ceppi americani (U) e ceppi africani (A).

Sono state disegnate diverse sonde per i **ceppi europei** di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1. Queste sono a livello di geni della glicoproteina E e della regione NS5-3'UTR:

- WNV_1a_E_NS5-3UTR_6_1
- WNV_1a_E__gE__2_1 (e la sonda con 1 nucleotide di differenza per i ceppi americani, considerata come controllo di specificità: WNV_1a_U__gE__2_1)

Sono state inoltre disegnate le seguenti sonde per distinguere tra ceppi virali sinora isolati in Francia e in Italia (e virus Africani geneticamente correlati; definiti Ei) e ceppi dell'est Europa (definiti Ee). In particolare sono state disegnate a livello della NS5-3'UTR e del gene che codifica per la glicoproteina E le seguenti sonde per i **ceppi virali che hanno circolato in Francia e in Italia** definiti Ei :

- WNV_1a__Ei_NS5-3UTR_2_1 (e la sonda con 1 nucleotide di differenza, considerata come controllo di specificità: WNV_1a__Eino_NS5-3UTR_2_1,)
- WNV_1a_Ei__gE__1_1

Sono state disegnate a livello di regione NS5 e del gene che codifica per la glicoproteina E le seguenti sonde per i **ceppi virali dell'est Europa**:

- WNV_1a_Ee_NS5_2_1 (e la sonda con 1 nucleotide di differenza, considerata come controllo di specificità: WNV_1a_EEeno_NS5_2_1
- WNV_1a_Ee__gE__1_1

Sono state disegnate a livello di regione NS5-3'UTR e di regione che codifica per la glicoproteina E le seguenti sonde per i **ceppi americani** di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1:

- WNV_1__U_NS5-3UTR_2_1 (e la sonda con 2 nucleotidi di differenza, considerata come controllo di specificità: WNV_1__Uno_NS5-3UTR_2_1)
- WNV_1a_U__gE__1_1
- WNV_1a_U__gE__2_1 (si distingue per 1 nucleotide dalla sonda per i ceppi europei, di cui rappresenta il controllo di specificità)

Infine, sono state disegnate, a livello del gene della glicoproteina E, sonde per i ceppi africani di WNV del primo *cluster* della linea genetica 1:

- WNV_1a_A__gE__1_1
- WNV_1a_A__gE__2_1

BDV- Borna Disease virus

Le sonde sono state disegnate all'interno delle regioni utilizzate per eseguire le RT-PCR riportate in letteratura (e da noi modificate per ottenere delle *nested* o *semi-nested* RT-PCR), o messe a punto dalla Unità Operativa 1. La strategia di RT-PCR di letteratura è basata sull'utilizzo di primer "universali" per tutti i *Bornavirus* a livello di ORFs che codificano per la p40 e la p24 [Kolodziejek et al., 2005]. La metodica messa a punto dalla Unità Operativa 1 si basa invece sull'amplificazione di una porzione del gene che codifica per la proteina M. Tali metodiche sono riportate in dettaglio nella fase 1N (preparazione del campione).

Sono state disegnate le sonde comuni a tutti i virus del genere *Bornavirus*, appartenenti in realtà ad un'unica specie, specifiche per il ceppo virale BDV No/98 e per tutti gli altri ceppi BDV, e per la caratterizzazione dei *clusters* genetici di BDV in base all'origine geografica. L'elenco e le principali caratteristiche delle sonde sono riportate in allegato 1, mentre di seguito vengono descritte le caratteristiche delle sonde ai fini diagnostici.

Sonde per il genere *Bornavirus*, specie *Borna Disease virus*. Sono state disegnate alcune sonde specifiche per le specie *Borna disease virus*, a livello di ORFs che codificano per la p40, la p24 e per la proteina M (quest'ultima corrisponde alla regione in cui è stata disegnata la sonda utilizzata per la Real Time PCR messa a punto dalla Unità Operativa 1):

- ❖ BDV_all_p40_2_1
- ❖ BDV_all_p24_1_1
- ❖ BDV_all_p24_2_1
- ❖ BDV_all_M_1_1

Sonde per ceppi di BDV. Sono state disegnate alcune sonde specifiche per il ceppo No/98, e per tutti gli altri ceppi di BDV, dai quali si distingue. In particolare le sonde per **tutti gli altri ceppi di BDV** sono rappresentate da:

- ❖ BDV_noNO98_p40_2_1
- ❖ BDV_noNO98_p40_3_1
- ❖ BDV_nonNO98_p24_1_1

Le sonde specifiche per il **ceppo BDV No/98** sono rappresentate da:

- ❖ BDV_NO98_p40_3_1
- ❖ BDV_NO98_p24_3_1
- ❖ BDV_NO98_p24_1_1

Sonde per i cluster virali di BDV in base all'origine geografica. Sono state disegnate le seguenti sonde, a livello delle ORFs che codificano per la p40 e p24, specifiche per i ceppi tedeschi che circolano in Baviera (simili al ceppo RW98), definiti ceppi RW98 o **ceppi della Baviera**:

- ❖ BDV_RW98_p40_5_1

- ❖ BDV_RW98,vac_p40_2_1c (è una sonda comune con i ceppi vaccinali, e ha le due sequenze di controllo di specificità per i ceppi He/80-CH e V, con un nucleotide di differenza: BDV_he80,CH_p40_2_1b; BDV_V_p40_2_1a)
- ❖ BDV_RW98_p24_2_1 (ha come sequenza di controllo per la specificità la sonda con un nucleotide di differenza per i ceppi V-CH: BDV_V,CH_p24_2_1)
- ❖ BDV_RW98_p24_3_1
- ❖ BDV_RW98_p24_3_2

Sono state disegnate le seguenti sonde, a livello delle ORFs che codificano per la p40 e p24, specifiche per i ceppi tedeschi che circolano in Baviera e nella Baden-Württemberg (simili al ceppo di riferimento He/80), definiti ceppi He/80 o **ceppi della Baviera e della Baden-Württemberg:**

- ❖ BDV_he80no_p40_4_2
- ❖ BDV_he80_p40_5_1
- ❖ BDV_he80_p24_3_1
- ❖ BDV_he80,CH_p40_2_1b (è una sonda comune con i ceppi CH, e ha le due sequenze di controllo di specificità per i ceppi RW98- vaccinali e V, con un nucleotide di differenza: BDV_RW98,vac_p40_2_1c; BDV_V_p40_2_1a)

Sono state disegnate le seguenti sonde, a livello delle ORFs che codificano per la p40 e p24, che identificano i ceppi tedeschi che circolano in Sassonia-Anhalt e nelle zone confinanti settentrionali con la Sassonia (simili al ceppo vaccinale Dessau), definiti ceppi vaccinali o **ceppi della Sassonia-Anhalt e Sassonia:**

- ❖ BDV_vacc,CH_p40_5_1 (è una sonda comune con i ceppi CH)
- ❖ BDV_RW98,vac_p40_2_1c (è una sonda comune con i ceppi RW/98, e ha le due sequenze di controllo di specificità per i ceppi He/80-CH e V, con un nucleotide di differenza: BDV_he80,CH_p40_2_1b; BDV_V_p40_2_1a)
- ❖ BDV_vacc_p40_6_1a (con la sequenza di controllo di specificità per i ceppi non vaccinali, con un nucleotide di differenza: BDV_vacc_p40_6_1b)
- ❖ BDV_vacc_p24_3_1
- ❖ BDV_vacc_p24_2_1

Sono state disegnate le seguenti sonde, a livello delle ORFs che codificano per la p40 e p24, che identificano i ceppi tedeschi che circolano soprattutto nelle aree della Turingia e Bassa Sassonia (simili ai ceppi di riferimento V e H1766), definiti ceppi V o **ceppi della Turingia e Bassa Sassonia:**

- ❖ BDV_V_p40_2_1a (con le due sequenze di controllo di specificità per i ceppi RW98- vaccinali e He/80-CH, con un nucleotide di differenza: BDV_RW98,vac_p40_2_1c; BDV_he80,CH_p40_2_1b)
- ❖ BDV_V_p40_5_1

❖ BDV_V_p24_3_1

Sono state disegnate le seguenti sonde, a livello delle ORFs che codificano per la p40 e p24, che identificano i ceppi della Svizzera, del Liechtenstein e dell'Austria, definiti ceppi CH o **ceppi non tedeschi**:

- ❖ BDV_CH_8_1
- ❖ BDV_CH_p24_3_1
- ❖ BDV_vacc,CH_p40_5_1 (è una sonda comune con i ceppi vaccinali)
- ❖ BDV_he80,CH_p40_2_1b (è una sonda comune con i ceppi He/80, e ha le due sequenze di controllo di specificità per i ceppi RW98-vaccinali e V, con un nucleotide di differenza: BDV_RW98,vac_p40_2_1c; BDV_V_p40_2_1a)
- ❖ BDV_V,CH_p24_2_1 (è una sonda comune con i ceppi V, e ha come sequenza di controllo per la specificità la sonda con un nucleotide di differenza per RW798 BDV_RW98_p24_2_1)

Tra i ceppi non tedeschi si distinguono due ulteriori sotto-*cluster*, definiti CH1 e CH2. Per CH2 è stata disegnata una sonda specifica a livello di ORF che codifica per la p24:

- ❖ BDV_CH2_p24_3_3

MESSA A PUNTO DELLO SPOTTAGGIO DEL VETRINO PER TECNOLOGIA MICROARRAY

Messa a punto del protocollo di deposizione delle sonde (*array-printing*)

Per la messa a punto della deposizione delle sonde (*array-printing* o spottaggio) sono stati impiegati i vetrini epossilati (Genetix), costituiti da un vetrino per la microscopia ottica, la cui superficie è rivestita di un polimero in grado di legare covalentemente proteine e molecole di DNA modificate con un gruppo amminico.

Le sonde utilizzate per la messa a punto sono rappresentate dagli oligonucleotidi della lunghezza pari a circa 20-mer sintetizzati sulla base delle sequenze nucleotidiche dei geni della subunità catalitica della DNA polimerasi e delle due glicoproteine G e B dei virus erpetici, modificati per inserzione di un gruppo amminico all'estremità 5'-terminale:

- ❖ HV_a_varvet_DNAp_1_1
- ❖ EHV1_DNAp_3_2
- ❖ EHV4_Dnap_3_3
- ❖ EHV1_gG_1_1
- ❖ EHV4_gG_2_1
- ❖ EHV1_gB_1_2

Dato che la validità di un vetrino per *microarray* è sostanzialmente legata al sistema utilizzato per sensibilizzare la sua superficie, sono tutt'ora in corso alcune prove per valutarne le caratteristiche fondamentali quali la stabilità, la precisione, la ripetibilità, la risoluzione, la sensibilità, l'uniformità e il rapporto segnale su rumore di fondo.

Sono inoltre in corso prove con vetrini trattati in superficie con altre sostanze (aldeidi) sui quali è ugualmente possibile depositare sonde con modificazione terminale (amino *linker*).

La messa a punto del protocollo per la deposizione delle sonde prevede diversi passaggi, oltre all'identificazione del supporto più adeguato:

- l) valutazione dei parametri di spottaggio
- m) valutazione della qualità degli spot (spot check)
- n) creazione di un *subarray* per l'ottimizzazione dell'area di ibridazione
- o) messa a punto di un protocollo per l'ibridazione (vedi dopo)

Array-printing

Sono stati valutati diversi parametri di impostazione del robot (Spotter QArray2, Genetix) per la deposizione delle sonde. Tali parametri possono infatti variare in funzione del tipo di vetrini, del numero di sonde, del tipo/quantità di aghi (*pin*) utilizzati per la deposizione. Il protocollo individuato per la deposizione delle sonde impiegando lo *Spotter Qarray2 software* è stato utilizzato per le prove successive. Tale *software* controlla a sua volta il braccio meccanico che preleva le sonde dalla piastra e le deposita sui vetrini.

Lo schema finale (*slide layout*) delle sonde sui vetrini dipende principalmente da due fattori:

1. distribuzione delle sonde sulla piastra
2. *slide design*

Durante la messa a punto dello spottaggio è stato impiegato un solo *pin*, collocato sulla testina in posizione A1. Prima della deposizione di ogni sonda sui vetrini, sono stati depositati 15 spot di *pre-printing* su un normale vetrino da microscopio per eliminare dal *pin* l'eccesso di soluzione e regolarizzare forma e dimensioni degli *spot* del *microarray*. I *pre-printing spots* sono stati eseguiti ad una distanza di 700 μm l'uno dall'altro per evitare la contaminazione delle soluzioni depositate in momenti successivi. In tabella 1 sono elencate le specifiche riguardanti il posizionamento degli *spot* e gli spostamenti del *pin*, adottate per produrre i 2 *subarray* che costituiscono i *microarray* della serie "HV". I parametri di movimento del *pin* determinano le dimensioni degli *spots* e la precisione con cui viene prodotto il *microarray*. La pulizia del *pin* è stata effettuata con un ciclo che ripete per due volte un lavaggio e un'asciugatura di 3 secondi.

Le sonde da spottare sono state aliquotate in una piastra a 384 pozzetti alla concentrazione finale di 25 μM nel buffer di spottaggio dei vetrini in uso (Advaspot 2X), diluendo 10 μl di una soluzione madre 50 μM in 10 μl di buffer Advaspot 2X. Il volume e la concentrazione degli oligonucleotidi nella piastra sono determinanti al fine della buona riuscita dello spottaggio. La sessione di spottaggio è stata condotta alla temperatura controllata di 15 °C e con il 60 % di umidità per evitare un'eccessiva evaporazione.

Individuazione di due aree per l'ibridazione (subarray)

Il calcolo indicativo del numero di repliche che possono essere poste sul vetrino ovvero il numero di repliche dello stesso campione (sonda) che vengono poste nell'*array* dipende da principalmente dai seguenti fattori:

- il numero di campioni
- la distanza fra gli *spot* (minimo 135 μm)
- il diametro medio degli *spot* (70-80 μm)
- il numero degli aghi/*pin* utilizzati per lo spottaggio (e quindi l'area occupata sul vetrino)

Nei nostri esperimenti abbiamo adottato i parametri riportati in tabella 1 per le due aree di deposizione (*subarray*) UP-sub e BOT-sub.

Tabella 1

Array-layout		
Nr. spot di replica per array dopo caricamento: 10		
Diametro nominale degli spot (μM): 200		
Distanza tra gli spot, da centro a centro(μM): 350		
Parametri personalizzati nell'array		
2-a Posizione dello spot nell'array che si trova in alto a sinistra		
.....UP_sub	T	BOT_sub
Da sinistra (μm)	8600	13600
Dall'altro (μm)	12000	37000
2-b Dimensioni del subarray		
	UP_sub	BOT_sub
Larghezza (μm)	4500	4500
Altezza (μm)	3375.....	3375

Post-processamento del microarray

Ultimato l'*array-printing* il vetrino è stato mantenuto in condizioni di umidità costante *overnight*. Questa fase è necessaria per consentire al gruppo amminico presente all'estremità 5'-terminale delle sonde di reagire con la superficie attivata del vetrino, formando un legame covalente. La camera umida è stata creata utilizzando un contenitore sigillato contenente pochi centimetri di una soluzione satura di cloruro di sodio. I *microarray* sono stati alloggiati all'interno della camera su di un supporto asciutto. Al termine della permanenza in camera umida la superficie del vetrino è stata stabilizzata secondo il protocollo fornito dal produttore:

1. immergere il vetrino in una soluzione 0,2% SDS per 5 minuti,
 2. risciacquare con H₂O bidistillata per eliminare il SDS,
 3. mantenere il vetrino in H₂O bidistillata per 30 minuti a 50°C,
 4. asciugare celermente il vetrino manualmente o in centrifuga (per 3 minuti a 800 rpm, se permangono tracce di umidità ripetere la centrifugazione). Il vetrino non deve asciugarsi prima della centrifugazione, altrimenti si formano aloni che innalzano notevolmente il *background* della fluorescenza,
 5. conservare il *microarray* in un contenitore buio e asciutto fino al suo utilizzo.
- La qualità della deposizione sui vetrini è stata valutata impiegando la Spot Check Solution (Genetix).

VALUTAZIONE DEI DIVERSI METODI PER LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DA DIVERSE MATRICI BIOLOGICHE PER LA TECNOLOGIA MICROARRAY

La preparazione del campione (e dei controlli positivi) per la tecnologia *microarray* prevede fundamentalmente la messa a punto delle fasi di estrazione dell'acido nucleico, di amplificazione mediante PCR o RT-PCR e di marcatura dell'acido nucleico.

Estrazione del campione

Per l'estrazione dell'acido nucleico dai campioni e dai controlli positivi sono stati scelti, sulla base delle indicazioni di letteratura, due kit di estrazione, in base al tipo di acido nucleico.

Per i virus erpetici equini è stato utilizzato come *target* il DNA estratto da colture cellulari infettate con EHV-1 (ceppo Kentucky D) ed EHV-4 (ceppo 405/75) precedentemente ottenuti dall'Unità Operativa 1, considerati come controlli positivi. In particolare il DNA è stato estratto utilizzando il QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen), seguendo le indicazioni della casa produttrice con le modificazioni previste per l'estrazione di DNA virale. Il DNA estratto è stato quantificato mediante spettrofotometro ND-1000 (NanoDrop Technologies). Lo stesso kit verrà utilizzato per l'estrazione di DNA di colture cellulari infettate con SuHV-1 e BoHV-1, forniti dall'Unità Operativa 2, considerati come controlli di sensibilità e di specificità per alcune sonde.

Per i virus WNV e BDV verrà utilizzato come *target* l'RNA estratto da colture cellulari infettate con questi virus, già ottenuti dall'Unità Operativa 1. L'RNA verrà estratto, secondo quanto riportato dai protocolli di letteratura, utilizzando il QIAmp Viral RNA (Qiagen), seguendo le indicazioni della casa produttrice.

PCR o RT-PCR

Come già anticipato, per l'amplificazione dell'acido nucleico estratto sono state selezionate metodiche di PCR o RT-PCR di letteratura oppure messe a punto dalla nostra Unità Operativa. Tutte le metodiche sono descritte di seguito.

La nostra Unità Operativa valuterà inoltre l'utilità di una *random* PCR descritta in letteratura (e adattata per essere utilizzata anche come RT-PCR), che consentirebbe di amplificare il materiale genetico di qualunque virus, sia a DNA che a RNA, presente nel campione senza ricorrere a PCR specifiche per ciascun virus, con un evidente risparmio di tempo e un notevole vantaggio economico [Wang et al., 2002; Kessler et al., 2004].

Per i virus erpetici equini **EHV-1 e EHV-4** sono state utilizzate 4 metodiche di PCR, che amplificano 4 geni differenti: la subunità catalitica della DNA polimerasi, la glicoproteina G, la glicoproteina B, la glicoproteina E. È stata scelta per quasi tutte le PCR la strategia di *semi-nested* PCR per prevenire eventuali falsi negativi dovuti a scarsa sensibilità della PCR [Borchers & Slater, 1993].

La regione che codifica per la subunità catalitica della **DNA polimerasi** è stata amplificata mediante una *semi-nested* PCR di letteratura, da noi lievemente modificata,

che utilizza quattro primer universali per questo gene comune a tutti gli HV, definita strategia DFASA/QAHNA-GDTDIB [Rose, 2005]. La modifica da noi apportata riguarda la sostituzione del *primer* DFASA con il *primer* SLYPIA, disegnato da Rose e collaboratori, che presenta meno degenerazioni [Rose, 2005].

La regione che codifica per la **glicoproteina G** è stata amplificata utilizzando una metodica di *semi-nested* PCR messa a punto dalla nostra Unità Operativa specifica per i virus erpetici degli equidi appartenenti al genere *Varicellovirus* (EHV-1, EHV-4, EHV-8, EHV-9). Sono stati utilizzati i seguenti *primer* da noi disegnati (la posizione dei *primer* è segnata rispetto al ceppo di riferimento EHV-1 ceppo Ab4 (NC_001491) nel quale il gene che codifica la glicoproteina G si estende dal nucleotide 127.681 al nucleotide 128.916):

- ❖ Forward esterno (nt 128.370) 5' ACC AGA CCC AAA CTC ATT TC 3';
- ❖ Reverse (nt 128.912) 5' GCA ACG TAC TCA AGT CGM TG3';
- ❖ Forward interno (nt 128.378) 5' CAA ACT CAT TTC TYG ATG AYG AG 3'.

Con l'utilizzo di questi *primer* si ottiene un prodotto di amplificazione di 633bp per EHV-4 e di 534bp per EHV-1.

Per ottimizzare le condizioni di reazione della *semi-nested* PCR sono state valutate diverse concentrazioni dei reagenti. Nel protocollo di PCR utilizzato, il templat virale è stato amplificato in una prima PCR che prevede 30 µl di una miscela di reazione contenente 3µl di GeneAmp PCR Gold Buffer (1x, 50 mM KCl, 15 mM Tris/HCl, pH 8.0; Applied Biosystems), 1,8 µl di MgCl₂ (1,5 mM), 3 µl di una miscela deossinucleotidi trifosfati (dNTPs; 0,2 mM di ciascun dNTP), 2µl di ciascun primer (20 picomol), 1,5 unità di AmpliTaq Gold (Applied Biosystem), e 2 µl di DNA. Il protocollo della prima PCR prevede una *hot start* a 95°C per 10 min, uno step di denaturazione a 95°C per 30 sec, uno step di *annealing* a 64°C per 30 sec, uno step di *elongation* a 72°C per 60 sec, ripetuti per 35 cicli, ed una *elongation* finale di 72°C per 5 min.

La seconda reazione di PCR è caratterizzata dall'amplificazione di 0,5 µl di prodotto ottenuto dalla prima amplificazione in una miscela di reazione di 30 µl finali, contenenti 3 µl di GeneAmp PCR Gold Buffer (1x, 50 mM KCl, 15 mM Tris/HCl, pH 8.0; Applied Biosystems), 1,8 µl di MgCl₂ (1,5 mM), 3 µl di una miscela deossinucleotidi trifosfati (dNTPs; 0,2 mM di ciascun dNTP), 2 µl di ciascun primer (20 picomol) e 1,5 unità di AmpliTaq Gold (Applied Biosystem). Il protocollo della seconda PCR prevede una *hot start* a 95°C per 10 min, uno step di denaturazione a 95°C per 30 sec, uno step di *annealing* a 61°C per 30 sec, uno step di *elongation* a 72°C per 60 sec, ripetuti per 35 cicli, ed una *elongation* finale di 72°C per 5 min.

La regione che codifica per la **glicoproteina B** è stata amplificata utilizzando una metodica di *semi-nested* PCR specifica per EHV-1 messa a punto dalla nostra Unità Operativa. Sono stati utilizzati i seguenti *primer* da noi disegnati (la posizione dei *primer* è segnata rispetto al ceppo di riferimento EHV-1 ceppo Ab4 (NC_001491) nel quale il gene che codifica la glicoproteina B si estende dal nucleotide 61.432 al nucleotide 64.374):

- ❖ Forward (nt 63.303) 5' CAT AGT CTC CGC AAC CCT TGA C3';

- ❖ Reverse esterno (nt 63.793) 5'TGT CGA TGT CGT AAA ACC TGA GAG C 3';
- ❖ Reverse interno (nt 63.685) 5'AGA AAC TCG CGG TCT TCC AAA AG 3'.

Con l'utilizzo di questi *primer* si ottiene un prodotto di amplificazione di 407bp per EHV-1.

Anche in questo caso sono state valutate diverse concentrazioni dei reagenti. Nel protocollo di PCR utilizzato, il templat virale è stato amplificato in una prima PCR che prevede 30 µl di una miscela di reazione contenente 3µl di GeneAmp PCR Gold Buffer (1x, 50 mM KCl, 15 mM Tris/HCl, pH 8.0; Applied Biosystems), 1,8 µl di MgCl₂ (1,5 mM), 3 µl di una miscela deossinucleotidi trifosfati (dNTPs; 0,2 mM di ciascun dNTP), 2µl di ciascun primer (20 picomol), 1,5 unità di AmpliTaq Gold (Applied Biosystem), e 2 µl di DNA. Il protocollo della prima PCR prevede una *hot start* a 95°C per 10 min, uno step di denaturazione a 95°C per 30 sec, uno step di *annealing* a 63°C per 30 sec, uno step di *elongation* a 72°C per 60 sec, ripetuti per 35 cicli, ed una *elongation* finale di 72°C per 5 min.

La seconda reazione di PCR è caratterizzata dall'amplificazione di 0,5 µl di prodotto ottenuto dalla prima amplificazione in una miscela di reazione di 30 µl finali, contenenti 3 µl di GeneAmp PCR Gold Buffer (1x, 50 mM KCl, 15 mM Tris/HCl, pH 8.0; Applied Biosystems), 1,8 µl di MgCl₂ (1,5 mM), 3 µl di una miscela deossinucleotidi trifosfati (dNTPs; 0,2 mM di ciascun dNTP), 2 µl di ciascun primer (20 picomol) e 1,5 unità di AmpliTaq Gold (Applied Biosystem). Il protocollo della seconda PCR prevede una *hot start* a 95°C per 10 min, uno step di denaturazione a 95°C per 30 sec, uno step di *annealing* a 64°C per 30 sec, uno step di *elongation* a 72°C per 60 sec, ripetuti per 35 cicli, ed una *elongation* finale di 72°C per 5 min.

La regione che codifica per la **glicoproteina E** verrà amplificata utilizzando i primer e le condizioni di amplificazione della metodica di Real Time PCR per EHV-1 e EHV-4 messa a punto dalla Unità Operativa 1.

Per il **WNV** sono state selezionate 3 metodiche di RT-PCR, che amplificano rispettivamente i geni della glicoproteina E, della regione NS5 e della regione NS5-3'UTR.

Prima dell'esecuzione delle 3 PCR si provvederà alla retrotrascrizione dell'RNA virale estratto (sintesi del cDNA), secondo quanto riportato in letteratura, mediante l'utilizzo del One-Step RT-PCR kit (Qiagen) seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Per l'amplificazione del gene che codifica la **glicoproteina E** verrà utilizzata una RT-PCR di letteratura specifica per il virus WNV [Berthet et al., 1997; Deubel et al., 1993]. In considerazione del fatto che le RT-PCR diagnostiche su campioni di campo potrebbero richiedere strategie per aumentare la sensibilità, la nostra Unità Operativa sta valutando la possibilità di utilizzare i primer per la glicoproteina E di Lanciotti e collaboratori come *primer nested* per la messa a punto di una strategia di *semi-nested* RT-PCR [Lanciotti et al., 2002; Siirin et al., 2004].

Per l'amplificazione della porzione del gene che codifica per la **NS5** verrà utilizzata una *semi-nested* PCR di letteratura che utilizza *primer* universali per tutti i *Flavivirus* [Scaramozzino et al., 2001].

Per l'amplificazione della **regione NS5-3'UTR** verrà utilizzata una RT-PCR di letteratura che utilizza *primer* universali per i *mosquito-borne Flavivirus* [Pierre et al., 1994].

Per il **BDV** sono state selezionate 5 metodiche di RT-PCR, che amplificano i geni che codificano rispettivamente per la p40, la p24 e la proteina M.

Prima dell'esecuzione delle PCR si provvederà alla retrotrascrizione dell'RNA virale estratto come descritto per WNV.

Per l'amplificazione dell'ORF che codifica per la **p40** verranno utilizzate due RT-PCR di letteratura che utilizzano coppie di *primer* in grado di amplificare tutti i *Bornavirus* (primer BDV1F-BDV796R, BDV218f-BDV652R) [Kolodziejek et al., 2005]. Le PCR diagnostiche descritte in letteratura per BDV prevedono normalmente una strategia di *nested* o *semi-nested* RT-PCR, pertanto stiamo valutando la possibilità di utilizzare questi *primer* per definire una strategia di *semi-nested* RT-PCR per l'amplificazione della p40 di BDV.

Anche per l'amplificazione dell'ORF che codifica per la **p24** verranno utilizzate due RT-PCR di letteratura che utilizzano coppie di *primer* in grado di amplificare tutti i *Bornavirus* (primer BDV1327F-BDV1837R, BDV1695F-BDV2138R) e sarà anche in questo caso valutata l'opportunità di ricorrere a una *nested* o *semi-nested* RT-PCR [Kolodziejek et al., 2005].

Per l'amplificazione dell'ORF che codifica per la **proteina M**, verranno utilizzati i *primer* e le condizioni di amplificazione della metodica di Real Time PCR per BDV messa a punto dalla Unità Operativa 1.

Marcatura e purificazione del DNA marcato

Per la marcatura del DNA amplificato si è deciso di utilizzare il *primer* complementare alla sonda, marcato con molecola fluorescente. La marcatura è stata quindi effettuata tramite PCR mediante incorporazione del *primer*, marcato con una molecola fluorescente (Cy5), all'interno del prodotto di amplificazione.

La marcatura del DNA *target* è stata effettuata, per il momento, solo utilizzando le PCR per gli HV, che amplificano porzioni della DNA polimerasi, della glicoproteina G e della glicoproteina B.

Il campione di DNA così marcato è stato successivamente purificato utilizzando un kit di purificazione per l'eliminazione dei fluorofori in eccesso, secondo quanto riportato dal protocollo della casa produttrice (Illustra AutoSeq™ G50, GE healthcare).

Il livello di incorporazione della molecola fluorescente è stato successivamente valutato mediante analisi allo spettrofotometro (Nanodrop).

La nostra Unità Operativa sta valutando la possibilità di verificare la validità di altri metodi di marcatura diretta o indiretta.

VALUTAZIONE DI DIVERSE CONDIZIONI DI IBRIDAZIONE DEL MICROARRAY

Hanno avuto inizio in questo periodo anche gli esperimenti per la messa a punto delle condizioni di ibridazione.

Messa a punto del protocollo di ibridazione delle sonde

Ibridazione

Il protocollo è stato messo a punto utilizzando le sonde per gli *Herpesvirus*.

La soluzione d'ibridazione è composta da SDS 0,1%, BSA 0,2 mg/ml e SSC (*Standard Sodium Citrate*) in concentrazione variabile a seconda del grado di stringenza desiderato.

Per assemblare la soluzione d'ibridazione, il DNA marcato e purificato è stato risospeso in un volume di acqua variabile, in base al metodo adottato per proteggere la soluzione dall'evaporazione durante l'incubazione a temperatura costante. In un caso la soluzione d'ibridazione, per un volume finale di 25 μ l, è stata protetta da telai In Situ Frames (Eppendorf, Germania), in grado di sigillare la regione d'ibridazione e creare uno spazio di capacità pari a 65 μ l.

Il *pellet* è stato risospeso nel volume d'acqua corretto, ed è stato effettuato un trattamento termico di denaturazione a 100°C per 10 minuti. Al termine del trattamento, i campioni di DNA sono stati posti rapidamente in ghiaccio.

La soluzione d'ibridazione è stata assemblata in ghiaccio, aggiungendo nell'ordine 20X SSC (cloruro di sodio 300 mM, citrato di sodio 30 mM), SDS 1% e BSA 10 mg/ml per arrivare alle concentrazioni finali desiderate.

La soluzione d'ibridazione è stata nuovamente trattata termicamente con un passaggio a 100°C per 2 minuti e posta velocemente in ghiaccio.

La soluzione d'ibridazione è stata depositata sul vetrino in corrispondenza della regione d'ibridazione ed è stata protetta con la pellicola dei telai In Situ Frames. Il *microarray* è stato posto in un contenitore sigillato contenente 150 ml di acqua, già equilibrata alla temperatura di ibridazione. L'ibridazione è stata condotta *overnight* in stufa a 42°C.

Sono stati successivamente eseguiti i lavaggi e il vetrino è stato analizzato con lo scanner.

Analisi mediante scansione del microarray

L'acquisizione dei dati relativi all'intensità del segnale di fluorescenza è stata effettuata con Scan Array Express (Packard Bell), gestito dal programma Scan Array Express 4.0 (Perkin Elmer). La calibrazione delle percentuali di potenza del laser e di guadagno del fotomoltiplicatore è stata gestita in modo autonomo, senza ricorrere alla funzione *autosensitivity calibration*. A tale scopo è stata effettuata una prima scansione ad una risoluzione di 50 μ m con la funzione *quick scan* disponibile tra le opzioni *tools*. L'immagine acquisita è stata analizzata con la funzione *line scan*, al fine di determinare empiricamente le condizioni per ottenere il massimo segnale raggiungibile, ma evitare la contemporanea saturazione del segnale relativo agli *spot* più intensi. Definite le condizioni migliori, le immagini sono state acquisite ad una risoluzione di 10 μ m.

Risultati preliminari

Dai primi esperimenti condotti è stato possibile solamente valutare la qualità degli spot utilizzando la Spot Check Solution ma nessun segnale relativo all'ibridazione del DNA marcato sulle sonde complementari alle sequenze per HV. La soluzione dei problemi di ibridazione può essere studiata attraverso il miglioramento dei seguenti passaggi sperimentali:

-Uso di vetrini con superficie trattata con sostanze diverse (aldeide)

-Protocollo di marcatura: (i) PCR asimmetrica con concentrazione di *primers* marcati maggiore di quelli non marcati) (ii) incorporazione di nucleotidi marcati durante amplificazione del *target*.

ALLEGATO 1. Sonde per tecnologia microarray

GRUPPO	virus	Nome sonda	seq sonda 5'-3'	nt sonda	Tm	GC%	δG	t δG	self dim
BDV	BDV all	BDV all p24 1 1	GGAAGAACCCTCCATGATCTC	22	56,9	54,2	0	25	-5
BDV	BDV all	BDV all p24 2 1	TGGAGACAATGAAGCTCATGATGG	24	57	45,8	0,8	32	-8
BDV	BDV all	BDV all M 1 1	TAATCGTCCCTGGATGGCCACA	23	62,4	56,5	0,9	37	-9
BDV	BDV CH	BDV CH 8 1	GGTAGGCTCCCTTGATTGT	20	54	50	0,3	29	-5
BDV	BDV CH	BDV CH p24 3 1	TCACTCTGACAGCATCAGAATCCTT	25	57,8	44	-3	52	-7
BDV	BDV CH2	BDV CH2 p24 3 3	TGA TCA CTC TGA CAG CAT C AGA	22	57,8	50	0,1	24	-8
BDV	BDV he80	BDV he80no p40 4 2	AAAGTTTTACGGGGAAAAGACAACA	25	55,5	36	0,5	20	-6
BDV	BDV he80	BDV he80 p40 5 1	GGATCGTCATCTAAGATTAAGC	23	51,1	39	0	25	-5
BDV	BDV he80	BDV he80 p24 3 1	CCACTCCGATAGCATCAGAATCCTT	25	58,3	48	0,2	28	-4
BDV	BDV he80,CH	BDV he80,CH p40 2 1b	CTCGTGAATCTTACCTGTCTGA	21	53,9	47,6	0,2	28	-7
BDV	BDV NO/98	BDV NO98 p40 3 1	TGGAGAGAAGACTACACAACGAGAGC	26	59,5	50	0,3	18	-3
BDV	BDV NO98	BDV NO98 p24 3 1	ACCCTCACACCCCGCACCAC	20	65	70	nd	nd	-4
BDV	BDV NO98	BDV NO98 p24 1 1	GCAGAAGAAGTCCGTGGCACC	21	60,8	62	0,4	19	-4
BDV	BDV nonNO98	BDV noNO98 p40 2 1	TGCTAATCCAGGACTGCACGC	22	61,9	59	0,3	30	-7
BDV	BDV nonNO98	BDV noNO98 p40 3 1	ACAGACTTTGAGTCCCAGGT	21	58	52,4	1,4	40	-5
BDV	BDV nonNO98	BDV nonNO98 p24 1 1	TGCCCTCCCATCTGCACCT	20	63,8	65	0,2	27	-7
BDV	BDV RW98	BDV RW98 p40 5 1	GGATCGTCATCTAAGATTAAGG	22	50,1	41	0	25	-5
BDV	BDV RW98	BDV RW98 p24 2 1	TACCCTTGGAGACATCTGGGC	21	58,5	57	0,8	33	-5
BDV	BDV RW98	BDV RW98 p24 3 1	CCACTCCGACAGCATCAGAATCCTT	25	60,2	50,6	0,1	24	-4
BDV	BDV RW98	BDV RW98 p24 3 2	TGACCACTCCGACAGCATCAGAATCCTT	25	60,5	52	0,1	24	-4
BDV	BDV RW98,vacc	BDV RW98,vac_p40_2_1 c	CTCGTGAATCTTACTTGTCTGA	21	52	42,9	0,2	28	-7
BDV	BDV V	BDV V p40 2 1a	CTCGTGAATCCTACCTGTCTGA	21	55,9	52,4	0,2	28	-7
BDV	BDV V	BDV V p40 5 1	GGATCGTCGTCTAAGATCAAAG	22	52,8	45,5	1,9	39	-5
BDV	BDV V	BDV V p24 3 1	GATCCTCGGCGAGAACATCAA	21	57	52,4	0,5	33	-7
BDV	BDV V,CH	BDV V,CH p24 2 1	CACTCTTGGAGACATCTGGGC	21	57,4	57	-1	39	-5

BDV	BDV_vacc	BDV_vacc_p40_6_1a	CAGGAGCCGAACAGATCAAGA	21	56,7	52,4	0	25	-5
BDV	BDV_vacc	BDV_vacc_p24_2_1	CCTTGGGGACATCTCAGCTC	20	57,5	60	-	31	-6
BDV	BDV_vacc	BDV_vacc_p24_3_1	CCACTCTGACAGCATCAAATCCTC	25	57,7	48	-	28	-4
BDV	BDV_vacc,CH	BDV_vacc,CH_p40_5_1	GGATCATCATCTAAGATTAAG	23	49	35	0	25	-5
BDV	BDV_vaccNO	BDV_vacc_p40_6_1b	CAGGAGCCGAGCAGATCAAGA	21	59	57	-	28	-5
BDV	BDVall	BDV_all_p40_2_1	TGGCATTGTTAGACCAGTCACG	22	57,3	50	-	31	-5
EHV	EHV1	EHV1_DNAp_2_3	TGCCGTGTCTGAGGATAGCG	20	59,3	60	-	29	-3,6
EHV	EHV1	EHV1_DNAp_3_1	TTT CCG AAA CCA CAA GCC	18	57,1	55	-	9	-5
EHV	EHV1	EHV1_DNAp_3_2	GCGAGCTGCTGGAGGACAA	19	60,4	63,2	-	35	-6
EHV	EHV1	EHV1_gG_1_2	CCCACGTACCCTCAAGTGCTGCA	23	63	60,9	-	30	-7
EHV	EHV1	EHV1_gG_1_1	GGAGGAGTCTAACAGCCCCGA	21	60,5	61,9	-	9	-3
EHV	EHV1	EHV1_gB_1_2	TCCTGGGGGACGTGATAGCT	20	60,1	60	-	37	-6
EHV	EHV1	EHV1_gB_2_1	CCCCCGTAACATTTACAATTACT	23	52,8	39,1	-	34	-6
EHV	EHV1	EHV1_gE_1_1	TGGGGCACAATAATCATCACTCC	22	57,7	50	-	0,1	-4
EHV	EHV1 n	EHV1neur_DNAp_4_2A	CCATCCGTCAACTACTCGA	19	53,7	52,6	-	30	-7
EHV	EHV1 nn	EHV1nonneur_DNAp_4_2B	ACC ATC CGT CGA CTA CTC	18	53,4	55,6	-	21	-9
EHV	EHV1,4	EHV1-4_DNAp_6_1(20)	TACGTTCACTMTCGTTGGGC	20	55-57	52,5	-	37	-6,3
EHV	EHV1,4	EHV1-4_DNAp_6_2	GATTACGTTCACTMTCGTTGGG	22	53-55	47,7	-	38	-6,3
EHV	EHV1h	EHV1h_gB_1_3a	GACGTGATAGCTATAACGCACTG	23	55,3	48	-	37	-11
EHV	EHV1hn	EHV1_gG_1_4a	GGCAGGCCACAGGACCCGAGA	21	66,6	71,4	-	32	-9
EHV	EHV1hn	EHV1nh_gG_1_4b	GGCAGGCCACCGGACCCGAGA	21	69,1	76,2	-	32	-9
EHV	EHV1hn	EHV1hn_gB_1_3b	GACGTGATAGCCATAACGCACTG	23	57,9	52,2	-	37	-6
EHV	EHV2	EHV2_DNAp_3_1	CTGGCAGACATATTGGGCA	19	55,1	52,6	-	29	-4
EHV	EHV2	EHV2_DNAp_5_1	GCCCCGATGCCAGTTTTAA	20	58,3	55	-	9	-5
EHV	EHV3	EHV3_DNAp_3_5	TTGAGGCCAACTTTCCCGAG	20	57,6	55	-	20	-9
EHV	EHV4	EHV4_DNAp_2_2	GCCGCAACATGCTTCTCAA	20	56,8	50	-	39	-5
GRUPPO	virus	Nome sonda	seq sonda 5'-3'	nt sonda	Tm	GC%	δG	t δG	self dim
EHV	EHV4	EHV4_DNAp_2_3	GCAAACGGACTGTTGCCATG	20	57,5	55	-	37	-7
EHV	EHV4	EHV4_DNAp_3_3	TGGAAACAAACTTCCCAGGGG	21	57,6	52,4	-	36	-7
EHV	EHV4	EHV4_gG_1_5	CTGAAGCAGGCAGAGGGGC	19	61,2	68,4	-	28	-4
EHV	EHV4	EHV4_gG_2_1	ACAGCATCCACACGGAAGGG	20	60	60	-	38	-5
EHV	EHV4	EHV4_gE_1_1	ATCCATCTGAGGCAACAACTC	22	55,2	45,5	-	25	-3
EHV	EHV4nns	EHV4nns_gG_3_1b	CAGGCTGATTCTGTCTCGCCA	22	61,4	59,1	-	42	-6
EHV	EHV4ns	EHV4ns_gG_5_1a	CAGCAGATGACAGCATCCAC	21	58,7	57,1	-	39	-5

EHV	EHV5	EHV5 DNAp 5 1	CCG TGG CGG CCT GC	14	61,5	85,7	-	0,6	36	-9
EHV	EHV8	EHV8 gG 3 1	CAA TGC ACA CAC AGG GGG	18	56,8	61,1	0,6	10		-7
EHV	EHV9	EHV9 gG 1 2	CGCAGGAAAACCTTGAACGACC	21	56,8	52,4	0,4	18		-3
EHV	HV var vet	HV_a_varvetcat_DNAP_1 1	CGCGAYTGGCTKGC	14	52-57	71,4	-	0,9	38	-10
EHV	HV var vet	HV a varvet DNAP 1 1	CGCGACTGGCTGGC	14	57,6	78,6	-	0,9	38	-10
EHV	HV g eq	HV g eq DNAP 4 1	TCCAAGCGCTACATAGAGG	18	53,9	52,6	0,1	4	26	-13
EHV	HV var eq	HV a var eq gG 3 1	CACATGTGCCATGATAGG	18	50,6	50	-2	44		-12
WNV	DEN1,2,3	DEN_1,2,3_NS5-3UTR 1 1	CCTGTGAGCCCCGTCCAAGGACGT	21	64,1	66,7	1,3	4		-4
WNV	DEN4	DEN4 NS5 1 1	GGGGAAGGTCTGCACAGATTGG	22	60,2	59,1	-	0,4	31	-7
WNV	Flavi_gen	Flavi_gen NS5 1 1	ATHTGGTWTATGTGGYTNGG	20	47,6-57,5	44,2	2,6	47		-8
WNV	Flavi_JEV,WNV	Flavi_JEV,WNV_NS5-3UTR 1 1	GCCCTCAGAACCGTCTC	17	55,2	64,7	0,3	20		-4
WNV	Flavi_mosq	Flavi_mosq_NS5-3UTR 1 1	CTAGAGGTTAGAGGAGACCC	20	52,9	55	-	0,5	31	-4
WNV	Flavi_seroJEV	Flavi_seroJEV_NS5-3UTR 1 1	GTAGACGGTCTGCCTGCG	19	61,3	68,4	-	0,7	34	-4
WNV	Flavi_seroJEV	Flavi_seroJEV_NS5-3UTR 3 1	CAGGAGGACTGGGTTA	16	49,8	56,3	-1	37		-4
WNV	JEV	JEV NS5 2 1	GCAGGAAAGCAAGGAGGGAAA	21	57,9	52,4	-	0,3	30	-3
WNV	Leiv	Leiv gE 1 1	TGTGTCTCCAGCAGCCCCCA	20	63,8	65	1,1	5		-3
WNV	LIV	LIV NS5 1 1	CAGTGGTGGAGGAGTTGAGG	20	57,3	60	1,1	3		-2
WNV	Mod	Mod NS5 1 1	CGGGAGTTGAGTGGGGAGGA	21	63,2	66,7	1,5	21		-4
WNV	Rab	Rab gE 1 1	TCCCCCTCAGCCCCACGT	19	64,2	68,4	2,2	27		-6
WNV	RioB	RioB NS5 1 2	TGTCTGGAGGAGGGTATAGAGAG	22	59,2	59,1	0,6	15		-3
WNV	TBEV	TBEV NS5 1 1	TGAACTACCTGGGCTGGCA	19	58,9	57,9	0	25		-3
WNV	USU	USU NS5 1 1	TGGAGGAGGTGTTGAAGGACTTGG	24	60,6	54,2	0,5	15		-4
WNV	USU	USU NS5-3UTR 3 1	GCCCAAGCGAACAGACG	17	57	64,7	-	0,2	28	-4
WNV	WNV 1,2	WNV_1,2_NS5-3UTR 1 1	CAA CCC CAG GAG GAC T	16	53,6	62,5	-	0,8	30	-3
WNV	WNV 1,2	WNV_1,2_NS5-3UTR 2 1	CGGAGAGTGCAGTCTGC	17	55,8	64,7	-	0,8	37	-7
WNV	WNV 1,2	WNV_1,2_NS5-3UTR 2 2	TGCAGTCTGCATAGTGCC	19	57,6	57,9	-	0,8	35	-7
WNV	WNV 1 all	WNV 1 all NS5 2 1	CTGCGTGAAGTTGGCACCCCG	20	61,8	65	-	0,5	32	-5
WNV	WNV 1 all	WNV_1_all_NS5-3UTR 3 1	GCCCAATGTCAGACCACGC	19	59,3	63,2	1	2,5		-4
WNV	WNV 1a	WNV 1a NS5 1 1	CGGAGCTCGCTTCTGGAGTTC	22	60	59,1	-	0,4	29	-9
WNV	WNV 1a	WNV 1a NS5-3UTR 1 1	TGGATAGAGGAGAATGAATGGATG	24	53,9	41,7	2	-21		-1
WNV	WNV 1a	WNV 1a NS5-3UTR 4 1	CACATGTTGTAACCTCAAAGGCC	23	54,7	43,5	-	0,2	28	-9
WNV	WNV 1a	WNV 1a gE 1 1	CACTCAGGCAGGGAGATTCA	20	56,6	55	-1	38		-3
WNV	WNV 1a	WNV 1a gE 3 1	TTGGTCCATCGTGTGGTTTC	21	57,2	52,4	-	0,8	34	-5
WNV	WNV 1a A	WNV 1a A gE 1 1	TGGAAACTACCCACACAGATT	22	56,1	45,5	0,1	24		-5
WNV	WNV_1a_A	WNV_1a_A_gE_2 1	ACTTGAGAGATATGGAGAGGTGACG	25	59,4	52	-	30		-4

							0,3			
WNV	WNV 1a E	WNV_1a_E_NS5-3UTR 6 1	GGAAGTCAGGCCGGAAAATTT	21	55,9	47,6	1,3	9	-10	
WNV	WNV 1a E	WNV 1a E gE 2 1	GCTTGGAGAATATGGAGAAGTGACA	25	56,6	44	0,5	16	-4	
WNV	WNV 1a EE	WNV 1a EE NS5 2 1	AAAAACTGGGCTACATCCTGC	21	55,7	47,6	0,2	21	-3	
WNV	WNV 1a Ee	WNV 1a Ee gE 1 1	TGGAAAATACTCCACACAGATGGGG	25	58,7	48	-1	35	-7	
WNV	WNV 1a Eeno	WNV 1a Eeno NS5 2 1	AAAAACTGGGTTACATCCTGC	21	53,4	42,9	0,1	26	-3	
WNV	WNV 1a Ei	WNV_1a_Ei_NS5-3UTR 2 1	GGAACCGTGTCTGGATAGAGG	21	56,8	57,1	0,8	38	-4	
WNV	WNV 1a EI	WNV 1a Ei gE 1 1	TGGAAACTACTCCACACAGATTGGG	25	58,6	48	-1	35	-7	
WNV	WNV 1a Eino	WNV_1a_Eino_NS5-3UTR 2 1	GGAACCGTGTGGATAGAGG	21	55,3	52,4	0,8	38	-4	
WNV	WNV 1a U	WNV_1__U_NS5-3UTR 2 1	GGT CCC ATA TTC AGG AAA ACG AG	23	55,5	47,8	0	25	-5	
WNV	WNV 1a U	WNV 1a U gE 1 1	CGGAAACTACTCCACACAGTTGGA	25	60,4	52	0,7	34	-7	
GRUPPO	virus	Nome sonda	seq sonda 5'-3'	nt sonda	Tm	GC%	δG	t δG	self dim	
WNV	WNV 1a U	WNV 1a U gE 2 1	GCTTGGAGAATATGGAGAGGTGACA	25	58,2	48	0,5	16	-4	
WNV	WNV 1a Uno	WNV_1_Uno_NS5-3UTR 2 1	GGTCCATACTCAGGAAAACGGG	23	59,5	56,5	0,5	32	-6	
WNV	WNV 1b	WNV_1b_NS5-3UTR 2 1b	AATGGATGGAGGACAAAACCC	21	55,3	47,6	0,1	24	-3	
WNV	WNV 1c	WNV 1c gE 2 1	CGC TCG GGC ATA GAC ACA C	19	58,4	63,2	-1	38	-4	
WNV	WNV 2	WNV 2 NS5-3UTR 1 1	GGCAATCAATCAGGTCCGTTC	21	56,4	52,4	1	-3	-4	
WNV	WNV 2	WNV 2 gE 1 1	GTCTTCCTGGTTCACCGAGAA	22	58,8	54,5	0,5	32	-4	
WNV	YFV	YFV NS5-3UTR 1 1	CGGATACAAACCACGGGTG	20	58,4	60	0,3	31	-4	

VALUTAZIONE DI DIVERSE CONDIZIONI DI IBRIDAZIONE DEL MICROARRAY

La messa a punto della metodica di microarray ha previsto il continuo e contemporaneo perfezionamento delle fasi di selezione delle sonde e spottaggio e preparazione del campione sulla base dei risultati ottenuti in seguito alla fase di ibridazione del campione. Viene riportata di seguito la messa a punto finale di ciascuna fase coinvolta nella messa a punto finale delle condizioni di ibridazione del *microarray*.

Messa a punto dello spottaggio del vetrino per tecnologia microarray

Il perfezionamento della messa a punto dello spottaggio ha previsto a sua volta un'ulteriore selezione delle sonde migliori rispetto a quanto già riportato nel Report precedente, la selezione dei vetrini, la scelta dello *slide design* migliore e la metodica per ottenere il legame covalente delle sonde al vetrino e il blocking.

La **selezione delle sonde** con le migliori caratteristiche di sensibilità e specificità per i diversi virus in esame è stata effettuata sulla base delle indicazioni derivate dai risultati ottenuti durante la messa a punto della fase di ibridazione del campione (fase 1o).

Tutte le sonde utilizzate per la messa a punto sono rappresentate dagli oligonucleotidi della lunghezza pari a circa 20-mer sintetizzati sulla base delle sequenze nucleotidiche dei geni di interesse e modificati per inserzione di un gruppo amminico all'estremità 5'-terminale

Sono state testate le sonde disegnate sulla DNA polimerasi, sulla glicoproteina G e sulla glicoproteina B per gli herpes virus, sulla regione NS5, NS5-3'UTR e glicoproteina E per WNV e sulla p24 e p40 per BDV. Per questioni economiche si è deciso in un primo momento di non testare le sonde inizialmente previste come controllo di specificità e le sonde specifiche per EHV-1 e EHV-4 disegnate sulla glicoproteina E.

Sulla base dei risultati sono state disegnate alcune nuove sonde e quindi selezionate per l'array diagnostico le sonde con i segnali di fluorescenza specifici più elevati e sono state escluse le sonde caratterizzate da segnali aspecifici. Nel caso delle sonde per EHV, i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando alcune sonde disegnate sulla DNA polimerasi e sulla glicoproteina G. Le sonde disegnate sulla glicoproteina B hanno invece dato segnali aspecifici o di bassa intensità di fluorescenza. Inoltre, sulla base delle indicazioni di sensibilità delle reazioni di amplificazione, si è deciso di tenere due sole reazioni di amplificazione per virus e si è quindi deciso di utilizzare solo le sonde disegnate sulle due regioni DNA polimerasi e glicoproteina G per i virus erpetici (vedi oltre). Nel caso di WNV, i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando alcune sonde disegnate sulla regione NS5 e NS5-3'UTR. Le sonde disegnate sulla glicoproteina E di WNV hanno invece dato segnali aspecifici o di bassa intensità di fluorescenza, e sono state pertanto scartate dall'array diagnostico. Nel caso di BDV sono state selezionate e tenute le migliori sonde disegnate sulla p24 e p40.

In allegato 1 sono riportate le 40 sonde selezionate per l'array diagnostico finale.

In particolare si tratta delle seguenti 12 sonde per identificare EHV:

- c) Sonda per il genere *Varicellovirus* (HV_a_varvet_DNAp_1_1)
- d) Sonda per i *Varicellovirus* degli equini (HV_a_var_eq_gG_3_1)
- e) Sonde specifiche per EHV1 e EHV4 (EHV1-4_DNAp_6_1(20))
- f) Sonde specie specifiche per EHV1 (EHV1_DNAp_3_2; EHV1_gG_1_2; EHV1_gG_1_1)
- g) Sonde per ceppi virali EHV1 neuropatogeni e non neuropatogeni (EHV1neur_DNAp_4_2A; EHV1nonneur_DNAp_4_2B)
- h) Sonde specie specifiche per EHV4 (EHV4_DNAp_2_2; EHV4_DNAp_3_3; EHV4_gG_2_1; EHV4_gG_4_1)

Le 14 sonde per identificare WNV sono:

- Sonde specifiche per il sierogruppo *Japanese encephalitis virus* (Flavi_serogJEV_NS5-3UTR_1_1; Flavi_serogJEV_NS5-3UTR_3_1)
- Sonde specifiche per WNV linea genetica 1 e linea genetica 2 (WNV_1,2_NS5-3UTR_2_2; WNV_1,2_NS5-3UTR_4_2)
- Sonde specifiche per WNV linea genetica 1 (WNV_1,2_NS5-3UTR_4_2; WNV_1_all_NS5_2_1; WNV_1_all_NS5-3UTR_3_1)
- Sonde specifiche per WNV linea genetica 2 (WNV_2_NS5-3UTR_2_1; WNV_2_NS5_2_1)

- Sonde specifiche per il cluster WNV della linea genetica 1 che circolano in Africa, Europa, America e Medio Oriente, definito per semplicità primo cluster (WNV_1a_NS5_1_1)
- Sonde specifiche, secondo quanto già descritto nel Report precedente, per il cluster WNV linea genetica 1, primo cluster (a), ceppi europei (WNV_1a_E_NS5-3UTR_6_1), ceppi africani (WNV_1a_A_NS5-3UTR_6_1; WNV_1a_A_NS5_2_2), ceppi americani (WNV_1a_U_NS5-3UTR_6_1) oltre a una sonda che ha delle caratteristiche nucleotidiche identiche tra i ceppi europei e americani ma non quelli africani (WNV_1a_Ano_NS5_2_1)

Le 14 sonde per identificare BDV sono:

- Sonde specifiche per il genere *Bornavirus*, specie *Borna disease virus* (BDV_all_p40_3_1; BDV_all_p40_4_1; BDV_all_p24_1_1; BDV_all_p24_1_3)
- Sonde specifiche, secondo quanto già riportato nel Report precedente, per i ceppi o cluster di ceppi di BDV, in particolare per i ceppi RW98 o della Baviera (BDV_RW98_p24_3_1), ceppi He/80 o della Baviera e della Baden-Württemberg (BDV_he80_p24_3_1), ceppi vaccinali o della Sassonia-Anhalt e Sassonia (BDV_vacc_p24_2_1; BDV_vacc_p24_3_1), ceppi V o della Turingia e Bassa Sassonia (BDV_V_p24_3_1) e ceppi CH o non tedeschi (BDV_CH_p40_8_1; BDV_CH_p24_3_3), oltre a una sonda comune per i ceppi V e CH (BDV_V,CH_p24_2_1).

È opportuno sottolineare che, a differenza dei controlli positivi e di un campione di campo con elevate concentrazioni virali, nelle fasi di analisi dei campioni è stato necessario ricorrere a metodiche di semi-nested PCR e RT-PCR per ottenere una sensibilità adeguata dell'array e pertanto alcune sonde, disegnate in regioni esterne al tratto amplificato dai primer interni, non hanno più potuto dare alcun segnale positivo.

Si tratta in particolare delle sonde per il genere *Varicellovirus* e per la neurovirulenza di EHV1, per le quali le sequenze dei virus non presentavano altre regioni con caratteristiche adeguate e pertanto non è stato possibile disegnare altre sonde con le stesse caratteristiche.

La **selezione dei vetrini** migliori è stata eseguita considerando i risultati ottenuti utilizzando due tipi di vetrini con diverse caratteristiche: vetrini con polimero idrofilico contenente N,N-acryloyloxysuccinimide (NAS, LifeLineLab) e vetrini epossilati (Genetix).

I risultati preliminari hanno consentito di identificare correttamente ciascun virus utilizzando entrambi i vetrini. Tuttavia l'intensità di segnale è risultata differente utilizzando i diversi vetrini, con valori meno intensi per gli spot specifici e con valori di background più elevati per i vetrini epossilati. In qualche raro caso non è stata osservata ibridazione verso una delle sonde specifiche per il virus testato in questi vetrini. Pur con questi limiti, indipendentemente dal vetrino utilizzato, è stato sempre possibile identificare correttamente il virus. Si è pertanto deciso di utilizzare per le prove i vetrini epossilati in quanto molto più economici.

Slide design. Le sonde da spottare sono state aliquotate in una piastra a 384 pozzetti alla concentrazione finale di 50 μM nel buffer di spottaggio dei vetrini in uso. La sessione di spottaggio è stata condotta utilizzando il robot (Spotter QArray2, Genetix) per la deposizione delle sonde, alla temperatura controllata di 15 °C e con il 60 % di umidità per evitare un'eccessiva evaporazione.

Le sonde sono state spottate in 5 repliche alla concentrazione di 50 μM e lo slide design è stato modificato di volta in volta sulla base del numero di sonde testate.

Lo slide design definitivo ha tenuto conto delle sonde finali selezionate, delle condizioni finali di amplificazione e marcatura dell'acido nucleico necessarie per avere la migliore sensibilità e specificità e, anche per questioni economiche, della necessità di considerare al massimo un vetrino per animale da testare.

Pertanto, lo slide design definitivo ha previsto il disegno di tre sub-array identici per vetrino (denominati up, mid e bottom), in ciascuno dei quali sono state spottate tutte le sonde selezionate, in 5 repliche ciascuna.

Lo schema di ogni sub-array viene riportato in figura 1.

	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E		A	B	C	D	E		A	B	C	D	E
1	●	●	●	●	●	11	●	●	●	●	●	21	●	●	●	●	●	31	●	●	●	●	●
2	●	●	●	●	●	12	●	●	●	●	●	22	●	●	●	●	●	32	●	●	●	●	●
3	●	●	●	●	●	13	●	●	●	●	●	23	●	●	●	●	●	33	●	●	●	●	●
4	●	●	●	●	●	14	●	●	●	●	●	24	●	●	●	●	●	34	●	●	●	●	●
5	●	●	●	●	●	15	●	●	●	●	●	25	●	●	●	●	●	35	●	●	●	●	●
6	●	●	●	●	●	16	●	●	●	●	●	26	●	●	●	●	●	36	●	●	●	●	●
7	●	●	●	●	●	17	●	●	●	●	●	27	●	●	●	●	●	37	●	●	●	●	●
8	●	●	●	●	●	18	●	●	●	●	●	28	●	●	●	●	●	38	●	●	●	●	●
9	●	●	●	●	●	19	●	●	●	●	●	29	●	●	●	●	●	39	●	●	●	●	●
10	●	●	●	●	●	20	●	●	●	●	●	30	●	●	●	●	●	40	●	●	●	●	●

Fig. 1. Rappresentazione schematica di ogni sub-array: le colonne 1-40 identificano le sonde, dove in nero (colonne 1-12) le sonde per i virus erpetici (sonde 1-12), in rosso (colonne 13-26) le sonde per WNV (sonde 13-26) e in verde (colonne 27-40) le sonde per BDV(sonde 27-40); le righe A-E identificano le repliche.

Legame covalente delle sonde al vetrino e blocking. Ultimato l'*array-printing* il vetrino è stato mantenuto in condizioni di umidità costante, a 42°C, *overnight* per consentire al gruppo amminico presente all'estremità 5'-terminale delle sonde di reagire con la superficie attivata del vetrino, formando un legame covalente. La camera umida è stata creata utilizzando un contenitore sigillato contenente pochi centimetri di una soluzione satura di cloruro di sodio. I *microarray* sono stati alloggiati all'interno della camera su di un supporto asciutto.

Al termine della permanenza in camera umida la superficie del vetrino è stata stabilizzata (blocking) secondo il protocollo fornito dal produttore: immersione del vetrino in una soluzione 0,2% SDS per 5 minuti, risciacquo in H₂O bidistillata e mantenimento del vetrino in H₂O bidistillata per 30 minuti a 50°C, asciugatura celere del vetrino mediante centrifugazione (800 rpm per 3 minuti).

I vetrini spottati sono stati conservati in un contenitore buio e asciutto fino al loro utilizzo.

Valutazione dei diversi metodi per la preparazione del campione da diverse matrici biologiche per la tecnologia microarray

In questa fase sono stati utilizzati diversi controlli positivi e campioni per la messa a punto, sono stati messi a punto le metodiche di estrazione dell'acido nucleico, di amplificazione e di marcatura.

Campioni per la messa a punto della metodica. Si ricorda che sono stati utilizzati i seguenti controlli positivi, sequenziati per avere conferma delle loro caratteristiche genetiche utili ai fini dell'*array*, per la messa a punto della metodica:

- ❖ Per i virus erpetici equini è stato utilizzato il DNA estratto da colture cellulari infettate e inattivate con EHV-1 (ceppo Kentucky D), al sequenziamento identificato come neurovirulento, ed EHV-4 (ceppo 405/75) precedentemente ottenuti dall'Unità Operativa 1.

- ❖ Per i virus WNV e BDV è stato utilizzato l'RNA estratto da colture cellulari infettate e inattivate con questi virus, già ottenuti dall'Unità Operativa 1. Il WNV è il ceppo Egypt 1951, come anche confermato al sequenziamento mentre i ceppi di BDV sono il ceppo Bo-MDBK e il ceppo C6. Il ceppo Bo-MDBK risulta al sequenziamento simile al ceppo V, mentre il ceppo C6 è simile al ceppo He/80.

Inoltre, è stato utilizzato l'unico campione di campo a disposizione presso il laboratorio dell'UO10, rappresentato dal fegato di un puledro deceduto a pochi giorni di vita per infezione da EHV-1, come diagnosticato mediante metodica di PCR. Tale virus è stato sequenziato ed è risultato neuropatogeno.

È opportuno precisare che per la messa a punto della metodica finale è stato tuttavia necessario analizzare i campioni in cieco conferiti dall'UO1 (vedi fase 3b: Controllo degli stessi con i metodi messi a punto).

Estrazione acido nucleico. L'acido nucleico, sia che si tratti dei virus a DNA (controlli positivi EHV-1 e EHV-4, campione di campo di fegato di puledro) sia a RNA (WNV, BDV), è stato estratto utilizzando il kit QIAmp Viral RNA (Qiagen).

L'estrazione con un unico kit ha comportato un risparmio di tempo e di costi.

Amplificazione del campione e marcatura. Come già riportato, in un primo momento sono state amplificate le regioni codificanti per la DNA polimerasi, la glicoproteina G e la glicoproteina B per gli herpes virus, la regione NS5, NS5-3'UTR e glicoproteina E per WNV e la p24 e p40 per BDV.

In considerazione dei risultati delle sonde, che hanno previsto la selezione finale delle migliori sonde da utilizzare, e nel tentativo di rendere il più semplice ed economico possibile le procedure di amplificazione, si è deciso di tenere **due reazioni di amplificazione per l'identificazione di ciascun virus**, di cui ove possibile una generica e una specifica. Sono state selezionate pertanto le PCR o RT-PCR già riportate nel precedente report:

- per gli HV la seminested PCR di letteratura, con minori modificazioni, che amplifica una porzione del gene che codifica per la DNA polimerasi [Rose, 2005] e la nested PCR che amplifica una porzione della glicoproteina G messa a punto dalla nostra UO,
- per WNV la semi-nested RT-PCR di letteratura che amplifica la regione NS5 [Scaramozzino et al., 2001] e la RT-PCR che amplifica una porzione della regione NS5-3'UTR [Pierre et al., 1994].
- per BDV le RT-PCR che amplificano i geni p24 e p40. In particolare per l'amplificazione della ORF che codifica per la p24 e la p40 sono state utilizzate strategia di semi-nested RT-PCR basata sulla RT-PCR di Kolodziejek e collaboratori (2005), già descritte nel precedente report. In particolare per la semi-nested RT-PCR per la p24 sono stati utilizzati i primer con combinazioni diverse rispetto a quanto riportato in letteratura. Nella reazione esterna sono stati utilizzati i primer BDV1327F e BDV2138R e nella reazione di amplificazione interna lo stesso primer F (BDV1327F) e un primer reverse da noi modificato, corrispondete alla posizione

del primer di letteratura BDV1695F, da noi denominato BDV1695R (5'-ATT GTC TTC ATG GAG CGA TC-3'). Con l'utilizzo di questi primer si ottiene un prodotto di amplificazione di 811 bp nella reazione esterna e di 368 bp nella reazione nested. Per la semi-nested RT-PCR per la p40 sono stati utilizzati i primer con combinazioni diverse rispetto a quanto riportato in letteratura. Nella reazione esterna sono stati utilizzati i primer primer BDV1F e BDV796R e nella reazione di amplificazione interna il primer forward BDV218f e lo stesso primer R (BDV796R). Con l'utilizzo di questi primer si ottiene un prodotto di amplificazione di 796 bp nella reazione esterna e di 580 bp nella reazione nested.

Sono state valutate diverse procedure di **amplificazione del campione**, con diverse finalità:

- reazioni di PCR (o RT-PCR) non nested specifiche per ogni virus e per ogni gene.
- per aumentare la sensibilità della metodica, reazioni di PCR (o RT-PCR) nested o semi-nested specifiche per ogni virus e per ogni gene, tranne NS5-3'UTR di WNV.
- per ridurre i tempi e i costi di preparazione del campione e per semplificare le procedure operative, sono state inoltre messe a punto e testate le PCR e RT-PCR *multiplex* per ciascun virus.
- Inoltre è stata utilizzata una *random* PCR e RT-PCR descritta in letteratura (Wang et al., 2002) che consente di amplificare il materiale genetico di qualunque virus, sia DNA che RNA, presente nel campione senza ricorrere a PCR specifiche.

Sono state inoltre valutate diverse procedure di **marcatura** dell'acido nucleico:

- La marcatura del DNA target è stata effettuata contestualmente all'amplificazione in PCR, mediante incorporazione del primer reverse interno marcato con una molecola fluorescente (Cy5) all'interno del prodotto di amplificazione.
- È stato valutato un ulteriore metodo di marcatura, utilizzando dNTPs marcati con sostanza fluorescente incorporati nel prodotto di amplificazione.

Sono stati infine testati come **campioni** per le fasi di ibridazione:

- singoli prodotti di amplificazione delle PCR o RT-PCR specifiche
- il *pool* dei prodotti delle singole PCR o RT-PCR specifiche: *pool* delle sole amplificazioni per i singoli virus (es. *pool* DNA polimerasi e glicoproteina G per EHV), *pool* di tutte le reazioni di amplificazione.

Relativamente alle diverse procedure di amplificazione del campione, i risultati delle diverse prove di ibridazione utilizzando i controlli positivi hanno messo in rilievo che i risultati di intensità di fluorescenza migliore sono stati ottenuti utilizzando metodiche di amplificazioni singole, in particolare per le metodiche di semi-nested. Relativamente a questo aspetto, l'analisi dei campioni (e quindi non dei controlli positivi) ha purtroppo

reso evidente la necessità di ricorrere a metodiche di semi-nested PCR o RT-PCR per avere un segnale di fluorescenza sufficientemente elevato. Purtroppo la preparazione dei controlli positivi mediante l'utilizzo di multiplex PCR e RT-PCR e di PCR e RT-PCR random non ha dato risultati valutabili: l'intensità di segnale di fluorescenza era al di sotto del limite di positività per le sonde specifiche oppure l'ibridazione del campione con le sonde specifiche era caratterizzata da assenza di segnale di fluorescenza.

Per quanto riguarda il metodo di marcatura, l'incorporazione del *primer*, marcato con una molecola fluorescente (Cy5), all'interno del prodotto di amplificazione ha dato risultati buoni di fluorescenza del segnale nei controlli positivi e nei campioni. Viceversa, i segnali di fluorescenza per le sonde specifiche sono risultati negativi nel caso del metodo di marcatura che prevede i dNTPs marcati con sostanza fluorescente incorporati nel prodotto di amplificazione.

L'ibridazione utilizzando il *pool* dei prodotti delle singole PCR specifiche per ciascun virus ha dato risultati paragonabili all'ibridazione delle singole PCR, con lieve riduzione dell'intensità di fluorescenza per le sonde specifiche che ha in ogni caso consentito di ottenere un risultato positivo. Il *pool* di tutte le reazioni di amplificazione ha invece dato una riduzione del segnale di fluorescenza tale da non permetterne l'utilizzo per l'array.

Amplificazione del campione e marcatura selezionati. Sulla base dei risultati ottenuti, al fine di ottenere una buona sensibilità della metodica array, e contemporaneamente cercare di semplificare le procedure operative, si è pertanto deciso di amplificare il campione mediante semi-nested PCR o RT-PCR singole per ciascun gene selezionato (EHV: DNA polimerasi e glicoproteina G; WNV: NS5; BDV: p24 e p40) e RT-PCR per la sola regione NS5-3'UTR di WNV, utilizzando il medesimo profilo di amplificazione.

In particolare è stato utilizzato per tutte le reazioni esterne il kit one-step RT-PCR (Qiagen). Il template è stato retrotrascritto e amplificato in un'unica reazione che prevede 35 µl di una miscela di reazione contenente 7 µl di 5x Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, 1,4 µl di una miscela deossinucleotidi trifosfati (dNTPs; 0,4 mM di ciascun dNTP), 2,8 µl di ciascun primer (0,8 µM), 2 µl di Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme mix, e 5 µl di DNA o di RNA. Il protocollo della reazione di RT-PCR prevede un ciclo di retro trascrizione a 50°C per 30 minuti, seguito uno step di attivazione dell'enzima a 95°C per 15 minuti e da 45 cicli che prevedono uno step di denaturazione a 95°C per 45 sec, uno step di *annealing* a 53°C per 45 sec, uno step di *elongation* a 72°C per 60 sec, ed una *elongation* finale di 72°C per 10 min.

La reazione interna, effettuata per tutte le amplificazioni tranne per la regione NS5-3'UTR di WNV per la quale non è stato possibile allestire una reazione interna, è caratterizzata dall'amplificazione di 2 µl di prodotto ottenuto dalla prima amplificazione in una miscela di reazione di 30 µl finali, contenenti 3 µl di GeneAmp PCR Gold Buffer (1x, 50 mM KCl, 15 mM Tris/HCl, pH 8.0; Applied Biosystems), 1,8 µl di MgCl₂ (1,5 mM), 6 µl di una miscela deossinucleotidi trifosfati (dNTPs; 0,4 mM di ciascun dNTP), 3 µl di ciascun primer (1 µM) e 1,5 unità di AmpliTaq Gold (Applied Biosystem). Il protocollo della PCR prevede una *hot start* a 95°C per 10 min, uno step di denaturazione a 95°C per 45 sec, uno step di *annealing* a 53°C per 45 sec, uno step di *elongation* a 72°C per 60 sec, ripetuti per 45 cicli, ed una *elongation* finale di 72°C per 10 min.

Il metodo di marcatura selezionato ha previsto l'utilizzo dei primer reverse interni marcati con sostanza fluorescente (Cy5). Solo nel caso della RT-PCR per l'amplificazione della regione NS5-3'UTR è stato marcato direttamente il primer reverse.

Il *pool* dei prodotti di semi-nested PCR o RT-PCR per ciascun virus è stato utilizzato per la fase di ibridazione.

Valutazione di diverse condizioni di ibridazione del microarray

Per quanto riguarda le diverse prove di ibridazione è stato necessario mettere a punto le condizioni di ibridazione, di acquisizione del segnale e di quantificazione e i criteri classificativi per l'analisi dei risultati. In tutte queste fasi è anche stato possibile valutare i risultati migliori in termini di sonde da utilizzare, vetrini migliori, modalità di amplificazione e di marcatura del campione, come già anticipato precedentemente.

Protocollo di ibridazione. I diversi prodotti di amplificazione sono stati mescolati a soluzione di ibridazione (SDS 0,1%, SSC 2x, BSA 2,2 mg/ml) per un volume finale di 30 μ l (20 μ l del campione amplificato e marcato + 10 μ l di soluzione di ibridazione). Nel caso di *pool* di semi-nested PCR o RT-PCR specifiche per ogni virus sono stati aggiunti 10 μ l di ciascuna reazione di amplificazione specifica per uno dei due geni.

I campioni sono stati sottoposti a denaturazione a 100°C per 10 minuti. Al termine del trattamento i campioni sono stati posti rapidamente in ghiaccio. Sono stati depositi 25 μ l di soluzione su ciascuna area di ibridazione del vetrino e coperti con vetrino coprioggetto. Rispetto alle prove preliminari è stato osservato che non sono necessari i telai In Situ Frames (Eppendorf, Germania), che pertanto non sono più stati utilizzati.

Il microarray è stato posto in camera umida e sono state testate diverse condizioni di temperatura e tempo di ibridazione. I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando una temperatura di 48°C e 3 ore di ibridazione.

Al termine dell'incubazione i vetrini sono stati sottoposti a lavaggi e analizzati allo scanner.

Acquisizione dati e quantificazione. L'acquisizione dei dati relativi all'intensità del segnale di fluorescenza è stata effettuata con Scan Array Express (Perkin Elmer). Le prime scansioni sono state effettuate per valutare la presenza o assenza del segnale di fluorescenza, calibrando le percentuali di potenza del laser e del guadagno del fotomoltiplicatore in modo autonomo ed effettuando una prima scansione ad una risoluzione di 50 μ m. L'immagine acquisita è stata analizzata al fine di determinare le condizioni per ottenere il massimo segnale raggiungibile evitando la contemporanea saturazione del segnale relativo agli spot più intensi. Definite le condizioni migliori, le immagini sono state acquisite ad una risoluzione di 10 μ m, e quantificate secondo il programma dello Scan Array Express, utilizzando *Lowess* come metodo di normalizzazione.

Analisi dei risultati. Per l'analisi dei risultati sono stati utilizzati due criteri classificativi: la media dei valori dei singoli spot per ogni sonda negativa, normalizzato a 50 e riportando a questo la media dei valori di intensità di fluorescenza delle singole

sonde e considerando positivo un valore di intensità di fluorescenza maggiore di 150, secondo quanto riportato da Li e collaboratori (2001), e il rapporto (Is/b) di intensità del segnale specifico rispetto al segnale del background, che è stato considerato positivo se maggiore di 3 (Korimbocus et al., 2005). I risultati preliminari hanno consentito di identificare correttamente ciascun virus utilizzando entrambi i criteri classificativi.

Per questioni di semplicità, si è deciso di utilizzare il criterio classificativo per l'intensità di fluorescenza secondo quanto riportato da Li e collaboratori (2001) e di considerare un campione positivo per un determinato virus in presenza di almeno 4 sonde specifiche positive. Inoltre, non essendo un dato importante ai fini diagnostici, si è deciso di non quantificare in termini assoluti il segnale di intensità di fluorescenza. Tuttavia, soprattutto per identificare le sonde specifiche relative ai ceppi virali, che spesso differiscono tra loro per un unico nucleotide, è stato necessario effettuare una quantificazione relativa, paragonando i segnali di fluorescenza normalizzati ≥ 150 tra le diverse sonde e considerare come positivo il segnale di fluorescenza normalizzato più elevato.

Elaborazione di procedure operative standard relative ai metodi sviluppati

A fine report sono riportate le procedure operative standard del metodo array sviluppato.

Valutazione preliminare delle caratteristiche di precisione e accuratezza dei diversi metodi

La metodica inizialmente messa a punto utilizzando le metodiche di PCR non nested ha permesso di identificare con precisione i controlli positivi e il campione di fegato di puledro infetto con EHV-1. In particolare il ceppo EHV-1 Kentucky e il campione di campo di EHV-1 sono stati identificati come ceppi neurovirulenti agli array, il ceppo WNV Egypt 1951 è stato identificato come ceppo Africano, il ceppo BDV Bo-MDBK come ceppo V o della Turingia e Bassa Sassonia e il BDV C6 come He/80 o della Baviera e della Baden-Württemberg, confermando i dati dei sequenziamenti. Relativamente al ceppo BDV C6 tuttavia va sottolineato che le sonde disegnate sugli altri ceppi hanno dato segnali di fluorescenza molto intensi.

Dopo la messa a punto finale del sistema, dovendo ricorrere alle metodiche nested di PCR per non ridurre la sensibilità della metodica, non è più stato possibile ottenere un segnale positivo dalle sonde per la neurovirulenza e da quella per i *Varicellovirus* in quanto con le metodiche nested non viene amplificata la porzione che si lega a queste sonde. In questo senso, pur mantenendo l'identificazione dei virus erpetici, si è persa la possibilità di caratterizzare la neurovirulenza dei ceppi di EHV1 che era uno degli obiettivi della messa a punto della metodica.

VERIFICA DEI METODI MESSI A PUNTO

Controllo degli stessi con i metodi messi a punto e Caratterizzazione di eventuali stiptipi rilevati nel corso delle attività di cui al punto b

Nell'ambito della verifica delle metodiche messa a punto, sono stati testati diversi campioni di WNV ottenuti dall'IZS di Brescia e campioni in cieco ottenuti dal'UO 1.

Campioni di WNV. In particolare sono stati forniti dall'IZS di Brescia i campioni inattivati di WNV NY99, 3 WNV isolati da volatili durante l'epidemia italiana WNV 203204, WNV 242853, WNV 229892 (ceppi Europei). I campioni sono stati confrontati con l'array del virus WNV controllo positivo, ceppo Egypt 195.

Sonda	WNV ny99	WNV 203204	WNV 242853	WNV 229892	WNV Egypt 1951
HV VARVET DNAp	-14	10	14	65	8
HV vareg gG 3 1	9	2	18	7	6
EHV-1-4 DNAp	35	12	-26	-21	1
EHV-1 DNAp	122	-30	62	20	22
EHV-1 Gg	131	92	53	17	2
EHV1 gG 1 2	87	27	51	15	-1
EHV-1 neurovirulent	14	-24	-27	-59	0
EHV-1 non neurovirulent	-15	16	-6	-39	1
EHV-4 DNAp	112	11	104	-22	6
EHV4 DNAp 3 3	217	87	15	-92	0
EHV-4 gG	18	-87	0	-31	-2
EHV4 gG 4 1	72	130	17	18	7
Fla serJ NS53 3 2	4.162	2.117	2.306	364	7.283
FLAVI SERJ NS53 11	822	1.520	944	338	2.735
WNV 1-2 NS53 22	1.200	2.749	332	314	7.451
WNV 1-2 NS5-3 4 2	15	143	38	175	1.217
WNV 1 NS53 21	15.810	15.847	15.949	31.880	8.425
WNV 1 NS53 31	1.880	4.902	1.051	182	5.948
WNV 2 NS53 2 1	70	34	108	-103	37
WNV 2 NS5 2 1	149	121	83	33	38
WNV 1a NS5 11	15.861	15.819	15.019	13.693	6.213
WNV 1aA NS53 6 1	73	291	91	122	815
WNV 1aA NS5 2 2	251	191	75	191	2.081
WNV 1aAno NS5 2 1	13.526	15.845	13.710	27.607	859
WNV 1aE NS5-3 6 1	-3	1.928	661	152	949
WNV 1aU NS5-3 6 1	1.352	2	38	63	444
BDV all p40 3 1	-26	-31	37	-112	0
BDV all p40 4 1	43	22	-40	-5	5
BDV all p24 1 1	40	2	43	-18	4
BDV all p24 1 3	7.837	2.210	44	635	2
BDV V-CH p24 2 1	-2	-53	50	69	7
BDV CH p24 81	51	3	-8	16	2
BDV CH p24 3 3	21	-60	18	5	6
BDV V p24 31	32	37	-62	25	15
BDV VACC p24 21	1.034	407	29	168	-1
BDV vacc p24 3 1	3	-19	5	25	1
BDV NO98 p40 31	243	52	21	221	-1
BDV NO98 p24 3 2	59	63	-6	52	1
BDV HE80 p24 31	21	41	-6	58	50
BDV RW98 p24 31	33	-26	43	40	5

Tabella 2. Intensità di fluorescenza normalizzata per i campioni di WNV analizzati mediante microarray. Un risultato è considerato positivo se ≥ 150 (Li et al., 2001).

Dall'analisi dell'intensità di fluorescenza si può osservare che i campioni risultano facilmente identificabili come WNV linea genetica 1, del primo cluster (che circolano in Africa, Europa, America e Medio Oriente) in quanto le sonde per il sierogruppo del *Japanese encephalitis virus*, per WNV linea genetica 1 e 2, e sonde specifiche per la linea genetica 1 e per il primo cluster risultano positive.

Relativamente all'identificazione dei ceppi, i campioni di WNV si identificano tutti come ceppi non Africani (positività sonda molto più elevata per WNV_1aAno_NS5_2_1 rispetto alle sonde per i ceppi africani), a differenza del ceppo Egypt 1999, controllo positivo, la cui media delle intensità per le sonde per i ceppi Africani è molto più elevata rispetto ai ceppi non africani, europei e americani. Inoltre, il campione WNV NY1999 si identifica come ceppo Americano mentre gli altri tre campioni ottenuti dall'IZS di Brescia si identificano come ceppi europei.

Purtroppo in qualche caso sono risultate positive alcune sonde in modo aspecifico. Tuttavia non sono mai numericamente tali da far considerare il campione un falso positivo secondo il criterio interpretativo adottato dalla UO 10.

Campioni in cieco. Sono stati forniti dall'UO 20 campioni in triplicato (ma in ordine diverso nelle tre repliche) in cieco da testare mediante microarray. Come anticipato, l'analisi di questi campioni ha di fatto evidenziato la necessità di utilizzare metodiche di semi-nested PCR e pertanto alcune sonde, in particolare per EHV, sono risultate inutilizzabili.

I campioni in cieco sono stati utili in quanto hanno consentito di riformulare i criteri interpretativi migliori ai fini diagnostici. In questo senso i primi 20 campioni (la prima replica) sono stati analizzati in un primo momento in cieco e in un secondo momento conoscendo il virus presente nel campione stesso per poter definire i criteri di interpretazione diagnostica.

A titolo di esempio si riportano le immagini dei microarray in seguito a scansione (Fig. 1) e i risultati della normalizzazione dell'intensità di fluorescenza (fig. 2) del campione Db 867 (nostro numero 34). Tale campione è stato indicato come BDV, ceppo He/80 o della Baviera e della Baden-Württemberg anche se il segnale di fluorescenza della sonda per il ceppo RW98 è molto elevato e rende difficile l'identificazione del ceppo.

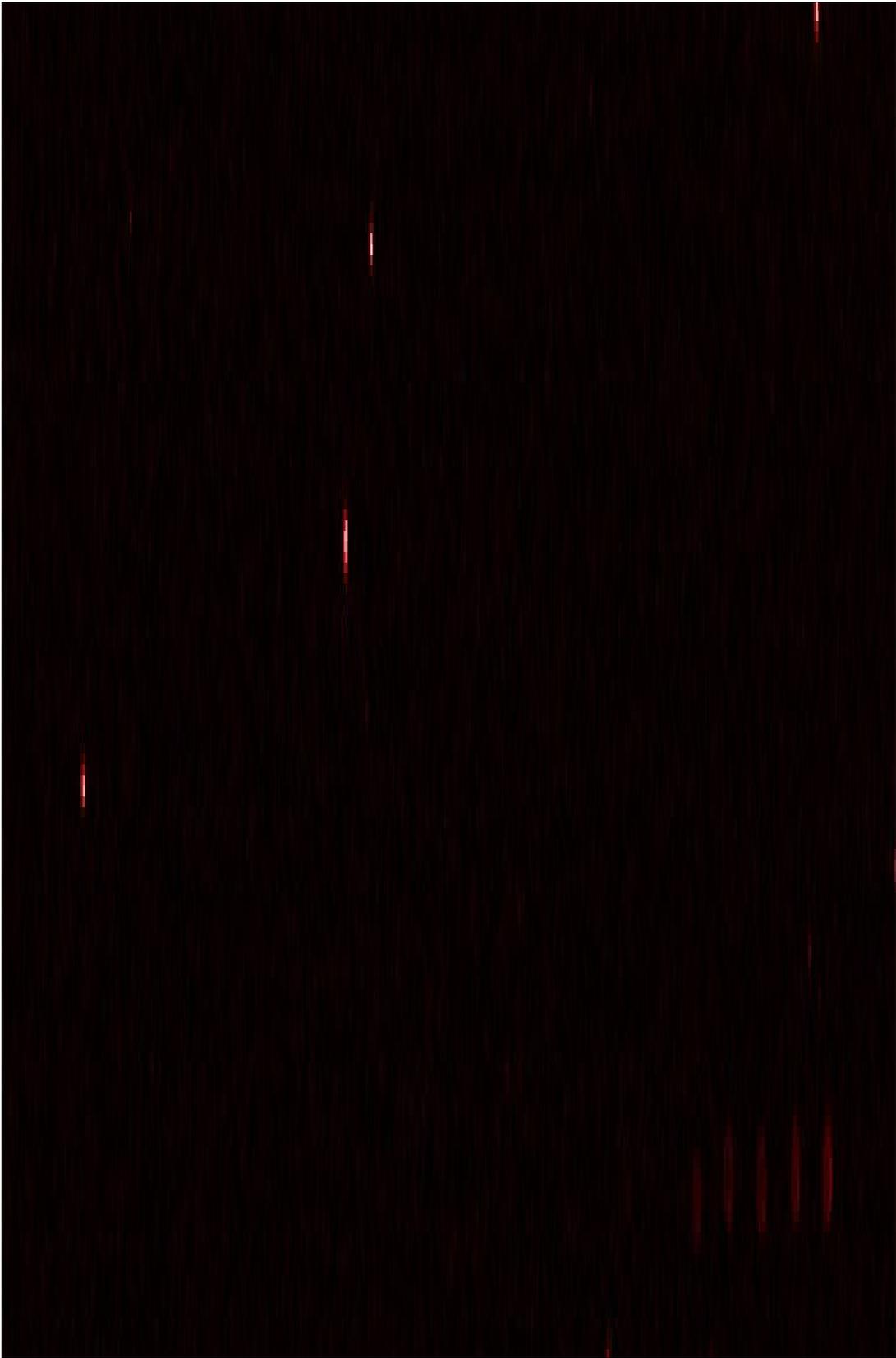


Fig. 1 Immagine microarray campione Db 867 (subarray bottom). È visibile il segnale di fluorescenza delle sonde 27 (BDV_all_p40_3_1), 28 (BDV_all_p40_4_1), 31 (BDV_V-CH_p24_2_1), 33(BDV_CH_p24_3_3), 34 (BDV_V_p24_31), 36 (BDV_vacc_p24_3_1), 39 (BDV_HE80_p24_31) e 40 (BDV_RW98_p24_31).

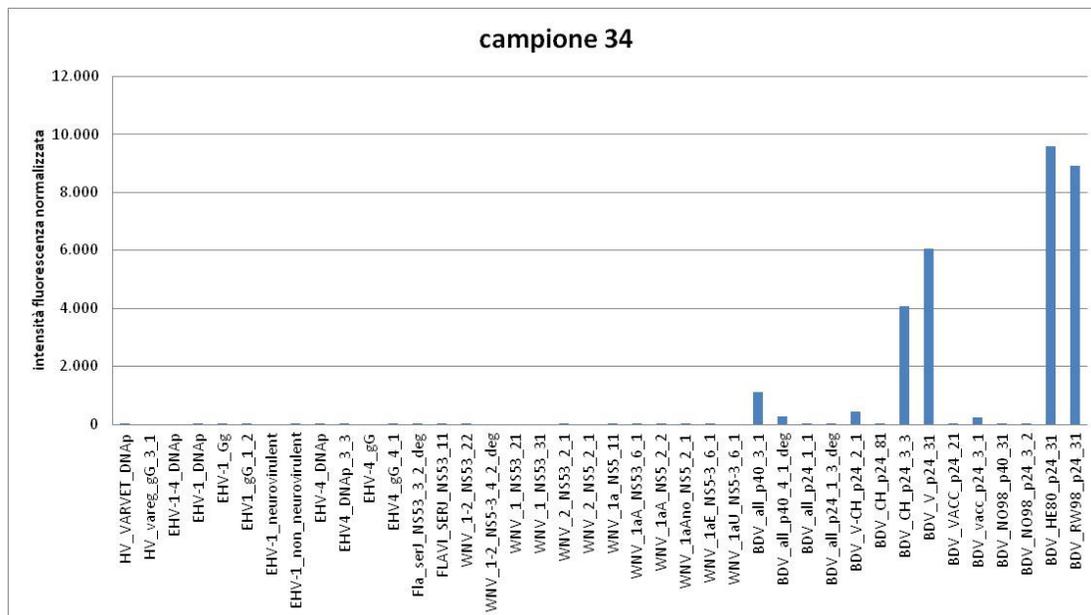


Fig. 2 Elaborazione dati fluorescenza campione Db 867 (campione 34), secondo il criterio interpretativo Li e collaboratori (2001). Le seguenti sonde risultano ≥ 150 e pertanto il segnale viene considerato positivo: BDV_all_p40_3_1; BDV_all_p40_4_1; BDV_V-CH_p24_2_1; BDV_CH_p24_3_3; BDV_V_p24_31; BDV_vacc_p24_3_1; BDV_HE80_p24_31 e BDV_RW98_p24_31.

I risultati delle analisi dei campioni in cieco sono riportate in tabella 3. Si ricorda che i primi 20 campioni sono serviti per la definizione dei criteri interpretativi della metodica. Dalla tabella si evidenzia come i ceppi di WNV siano facilmente identificabile (tranne in un caso) anche nei campioni in cieco, mentre per i ceppi di BDV l'intensità delle sonde è spesso molto simile e pertanto la distinzione in ceppi non è facile. I campioni risultati positivi per BDV non sono stati tuttavia sequenziati per verificare se il ceppo corrisponde a quello identificato dall'array diagnostico.

n. lab	ID	esito	ceppo
14	Da1049	EHV-1	nd*
15	Da1057	BDV	nd**
16	Da1080	EHV-1	nd*
17	Da1095	negativo	
18	Da1128	WNV	WNV 1a_A
19	Da1167	EHV-1	nd*
20	Da1379	WNV	WNV 1a_A
1	Da138	negativo	
2	Da167	negativo	
3	Da176	negativo	
4	Da178	negativo	
5	Da215	EHV-1	nd*
6	Da234	negativo	
7	Da334	WNV	WNV 1a_Ano
8	Da481	negativo	
9	Da664	negativo	
10	Da768	BDV	RW98
11	Da874	BDV	RW98
12	Da913	negativo	
13	Da993	WNV	WNV 1a_A
37	Db1187	negativo	
<i>continua</i>			
n. lab	ID	esito	ceppo
38	Db1227	BDV	RW98
39	Db1288	BDV	RW98
40	Db1348	negativo	
25	Db214	negativo	
21	Db25	negativo	
26	Db306	WNV	WNV 1a_A
27	Db308	negativo	
28	Db314	negativo	
22	Db36	negativo	
29	Db371	WNV	WNV 1a_A
23	Db44	EHV-1	nd*
30	Db490	negativo	
24	Db50	WNV	WNV 1a_A
31	Db612	EHV-1	nd*
32	Db709	negativo	
33	Db847	negativo	

34	Db867	BDV	He/80
35	Db899	EHV-1	nd*
36	Db934	EHV-1	nd*
54	Dc1017	negativo	
55	Dc1048	BDV	V
56	Dc1156	negativo	
57	Dc1278	negativo	
58	Dc1279	WNV	WNV 1a ***
59	Dc1298	negativo	
60	Dc1334	negativo	
42	Dc211	negativo	
43	Dc229	negativo	
44	Dc250	WNV	WNV 1a_A
45	Dc278	EHV-1	nd*
46	Dc498	BDV	RW98
47	Dc502	BDV	He/80
41	Dc55	EHV-1	nd*
48	Dc573	EHV-1	nd*
49	Dc596	WNV	WNV 1a_A
50	Dc618	EHV-1	nd*
51	Dc779	negativo	
52	Dc780	negativo	
53	Dc924	negativo	

Tab. 3 Risultati delle analisi mediante microarray nei campioni in cieco.

* non identificabile la neuropatogenicità di EHV-1 in seguito a necessità di utilizzare metodiche di nested PCR

** sonde ceppo V, He/80 e RW98 con intensità fluorescenza molto simili tra loro.

*** non identificabile il ceppo in quanto le sonde specifiche per i diversi ceppi sono negative.

Come già anticipato, relativamente all'identificazione del ceppo di BDV nei campioni in cieco, a differenza dei controlli positivi dove il segnale corrispondente al ceppo specifico era ben differenziabile dagli altri ceppi, è necessario sottolineare che le sonde diverse spesso sono caratterizzate da un segnale di fluorescenza molto elevato e pertanto non è chiaramente distinguibile il ceppo reale di BDV (Fig. 3). Pur con questi limiti è stato identificato il ceppo sulla base della maggiore intensità di fluorescenza della sonda relativa ai ceppi.

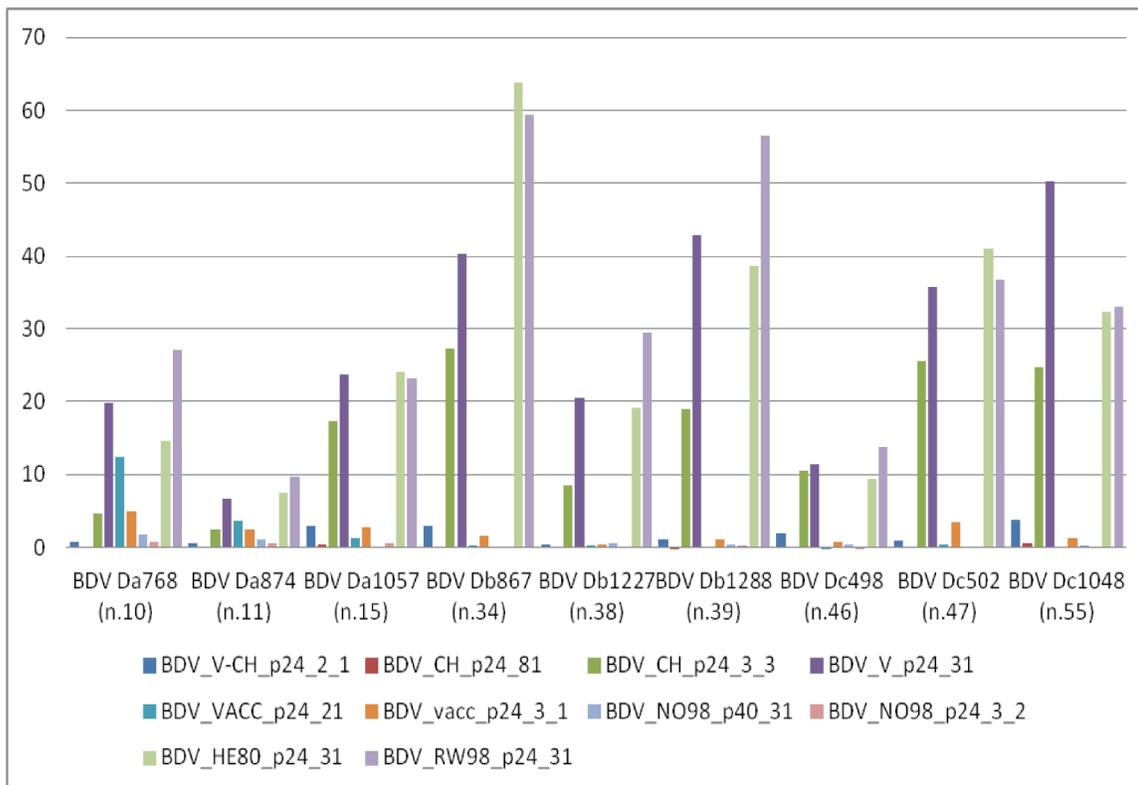


Fig. 3. Risultati segnali intensità di fluorescenza normalizzati e riportati al valore di 150 nei campioni in cieco risultati positivi per BDV all'array diagnostico.

Elaborazione statistica dei risultati per la tecnologia microarray

I pochi campioni di analizzati di WNV, pur essendo stati tutti confermati e identificati anche a livello di ceppo non consentono un'elaborazione statistica dei risultati. I risultati indicano in ogni caso una sensibilità del test del 100% per i campioni di WNV e per la caratterizzazione dei "ceppi".

I risultati sui campioni in cieco sembrano indicare che tale metodica potrebbe essere robusta anche in condizioni di campo nell'identificare i virus responsabili delle forme neurologiche dei cavali testati. Tuttavia, a parte per i ceppi di WNV, tale metodica pone alcune perplessità relativamente all'efficacia nell'identificazione del ceppo circolante, sia per problemi legati alle sonde stesse (soprattutto nel caso di BDV, dove le differenze nucleotidiche sono talmente ridotte da rendere difficile una distinzione sicura tra ceppi), sia per quanto riguarda la necessità di effettuare delle PCR nested per aumentare la sensibilità della metodica, come nel caso della neuro virulenza di EHV che comporta una perdita delle sonde da utilizzare. Relativamente alla soluzione di questi due aspetti, per quelle sonde dove la distinzione tra due ceppi si basa su uno o due nucleotidi, sarà possibile inserire in futuro nell'array, insieme alla sonda specifica per il ceppo, anche le altre sonde con il nucleotide diverso, al fine di comparare i risultati di intensità di fluorescenza e valutare la positività per la sonda più specifica. Inoltre, per valutare la

neurovirulenza dei ceppi EHV1, sarebbe necessario prevedere una terza metodica di PCR specifica per EHV1, aumentando tuttavia la complessità del sistema diagnostico.

In conclusione, la metodica di microarray appare attendibile per identificare i virus responsabili di forme neurologiche.

Tuttavia, da un punto di vista di utilità pratica, la necessità di ricorrere a metodiche di PCR target specifiche, i costi elevati e i tempi lunghi non rendono la metodica messa a punto mediante microarray una metodica facilmente utilizzabile da un punto di vista diagnostico. Potrebbe essere più pratico ricorrere ad amplificazione e successivo sequenziamento per l'identificazione del virus e del ceppo causa di malattia, soprattutto in considerazione dell'elevata probabilità di futura circolazione di ceppi virali nuovi, quali probabilmente quelli di WNV.

Bibliografia consultata per la realizzazione di un set diagnostico per EHV 1, EHV 4, WNDV e BDV mediante tecnologia microarray

- Albà M.M., Lee D., Pearl F.M.G. Shepherd A.J. Martin N., Orengo C.A., Kellam P. (2001). VIDA: a virus database system for the organization of animal virus genome open reading frame. *Nucl. Acid. Res.* 29 (1): 133-136.
- Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. (2005). Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 11(2):225-31.
- Berg M., Johansson M., Montell H., Berg A.-L. (2001). Wild birds as a possible reservoir of *Borna disease virus*. *Epidemiol. Infect.* 127: 173-8.
- Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP, Deubel V. (1997). Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol.*;78 (Pt 9):2293-7.
- Bodrossy L., Sessitsch A. (2004). Oligonucleotide microarrays in microbial diagnostics. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:245-54.
- Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Murrell JC, Radajewski S, Weilharter A, Sessitsch A. (2003). Development and validation of a diagnostic microbial microarray for methanotrophs. *Environ Microbiol.*; 5(7):566-82.
- Borchers K., Slater J. (1993). A nested PCR for the detection and differentiation of EHV-1 and EHV-4. *J Virol Methods*; 45(3):331-6.
- Borchers K., Böttner D., Lieckfeldt D., Ludwig A., Frölich K., Klingeborn B., Widen F., Allen G., Ludwig H. (2006). Characterization of Equid Herpesvirus 1 (EHV-1) related viruses from captive Grevy's Zebra and Blackbuck. *Virology.* 68 (7): 757-760.
- Brinton M.A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol.* 56:371-402.
- Buczynsky K.A, Kim S.K., O' Callagan D.J. (2005). Initial characterization of 17 viruses harbouring mutant forms of the immediate-early gene of equine herpesvirus 1. *Virus Genes* 31(2): 229-239.
- Chambers TJ, Halevy M, Nestorowicz A, Rice CM, Lustig S. (1998). West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness. *J Gen Virol.* 79 (Pt 10):2375-80.
- Damiani A. M, Matsumura T., Naoaki Y., Mikami T., Takahashi E. (2000). A deletion in the gI and gE genes of equine herpesvirus type 4 reduces viral virulence in the natural host and affects virus transmission during cell.to cell spread. *Virus Res.* 67: 189-202.
- Davison A.(2002). Evolution of the herpesviruses. *Vet. Microbiol.* 86: 69-88.
- Deubel V, Nogueira RM, Drouet MT, Zeller H, Reynes JM, Ha DQ. (1993). Direct sequencing of genomic cDNA fragments amplified by the polymerase chain reaction for molecular epidemiology of dengue-2 viruses. *Arch Virol.*;129(1-4):197-210.
- Ehlers B., Borchers K., Grund C., Frölich K., Ludwig H., Buhk H.J. (1999). Detection of DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR and Deoxyinosine-substituted primers. *Virus Genes* 18 (3): 211-220.

- Ficorilli N., Studdert M.J., Crabb B.S. (1995). The nucleotide sequence of asinine herpesvirus 3 glycoprotein G indicates that the donkey virus is closely related to equine herpesvirus 1. *Arch. Virol.* 140: 1653-1662.
- Hartley C.A., Drummer H.E., Studdert M.J. (1999). The nucleotide sequence of the glycoprotein G homologue of equine herpesvirus 3 (EHV3) indicates EHV3 is a distinct equid alphaherpesvirus. *Arch. Virol.* 144: 2023-2033.
- Hilbe M, Herrsche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K, Ehrensperger F. (2006). Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis.* 12(4):675-7.
- Ibrahim E.S.M., Kinoh M., Kennedy M., Allen G.P., Yamaguchi T., Fukushi H. (2006). Genetic relatedness and pathogenicity of equine herpesvirus 1 isolated from onager, zebra and gazelle. *Arch. Virol. Article in press*
- Jääkelainen A.J., Piiparinen H., Lappalainen M., Koskiniemi M., Vaehri A. (2006). Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight herpesviruses from clinical specimens. *J. Clin. Virol. Article in press*
- Karlin S., Mockarski E., Schachtel G. (1994). Molecular Evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *J. Virol.* 68 (3): 1886-1902.
- Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Marsh W, Steel A. (2004). Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J Clin Microbiol.*;42(5):2173-85.
- Kolodziejek J, Durrwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N. (2005). Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol.*;86(Pt 2):385-98.
- Kostić T, Weilharter A, Sessitsch A, Bodrossy L. (2005). High-sensitivity, polymerase chain reaction-free detection of microorganisms and their functional genes using 70-mer oligonucleotide diagnostic microarray. *Anal Biochem.*; 346(2):333-5.
- Korimbocus J, Scaramozzino N, Lacroix B, Crance JM, Garin D, Vernet G. 2005. DNA probe array for the simultaneous identification of herpesviruses, enteroviruses, and flaviviruses. *J Clin Microbiol.*;43(8):3779-87.
- Kuno G., Chang G-J.J., Tsuchiya R., Karabatsos N., Cropp C.B. (1998). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *J. Virol.*, 72(1): 73-83.
- Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD, Roehrig JT. (2002). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*; 298(1):96-105.
- Li H., Gailbreath K., Flach E. J., Taus N. S., Cooley J., Keller J., Russell G.C., Knowels D.P., Haig D.M., Oaks J.L., Taul D.L. (2005). A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. *J. Gen. Virol.* 86: 3021-3026.

- Li J, Chen S, Evans DH. 2001. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 696-704.
- Loregian A., Case A., Cancellotti E., Valente C., Marsden H., Palù G. (2006). Cloning, expression, and functional characterization of the Equine Herpesvirus 1 DNA polymerase and its accessory subunit. *J. Virol.* 80 (13): 6247-6258.
- Loy A, Bodrossy L. (2006). Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin Chim Acta.*; 363(1-2):106-19.
- Maeda K., Kai K., Matsumura T. (2005). Genomic diversity among Equine Herpesvirus-4 field isolates. *J. Med. Sci.* 67(6): 555-561.
- Marshang R.E., Gleiser C.B., Papp T., Pfitzner A. J.P., Böhm R., Roth B.N. (2006). Comparison of 11 herpesvirus isolates from tortoises using partial sequences from three conserved genes. *Vet. Microbiol.* 117: 258-266.
- McGeoch D., Frazer J.R., Davison A. (2006). Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res.* 117: 90-104.
- Monath TP. (1990). *Flaviviruses*. In: Virology, Fields BN, Knipe DM eds, pp 763-814.
- Nowotny N, Kolodziejek J, Jehle CO, Suchy A, Staeheli P, Schwemmler M. (2000). Isolation and characterization of a new subtype of Bornavirus. *J Virol.* 74(12):5655-8.
- Nugent J., Birch-Machin I., Smith K.C., Mumford J.A., Swann Z., Newton J.R., Bowden R.J., Allen G.P., Poynter-Davis N. (2006). Analysis of Equine Herpesvirus 1 strain variation reveals a point mutation of the DNA polymerase strongly associated with neuropathogenic versus nonneuropathogenic disease outbreaks. *J. Virol.* 80 (8): 4047-4060
- Patel, J. R., Heldens J. (2005). Equine herpesvirus 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4)-epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review. *Vet. J.* 170: 14-23
- Pierre V, Drouet MT, Deubel V. (1994). Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Res Virol.*;145(2):93-104.
- Pisoni G., Nativi D., Bronzo V., Bode L., Codazza D. (2006). Analisi sierologica ed epidemiologica dell'infezione da Bornavirus nella popolazione equina in Italia.
- Rose TM. (2005). CODEHOP-mediated PCR - a powerful technique for the identification and characterization of viral genomes. *Virol J.*; 2:20
- Siirin M, Sargent C, Langer RC, Parsons R, Vanlandingham DL, Higgs S, Tesh RB. (2004). Comparative sensitivity of the VecTest antigen-capture assay, reverse transcriptase-PCR, and cell culture for detection of West Nile virus in dead birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.*; 4(3):204-9.
- Stralis-Pavese N, Sessitsch A, Weilharter A, Reichenauer T, Riesing J, Csontos J, Murrell JC, Bodrossy L. (2004). Optimization of diagnostic microarray for application in analysing landfill methanotroph communities under different plant covers. *Environ Microbiol.*; 6(4):347-63.

- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. (2001). Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.*;39(5):1922-7.
- Scherret JH, Mackenzie JS, Hall RA, Deubel V, Gould EA. (2002). Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin viruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 267:373-90.
- Schindler AR, Vogtlin A, Hilbe M, Puorger M, Zlinszky K, Ackermann M, Ehrensperger F. (2006). Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes.* Aug 30; [Epub ahead of print].
- Telford E.A.R., Watson M.S., Perry J., Cullinane A.A., Davison A. (1998). The DNA sequence of equine herpesvirus -4. *J. Gen. Virol.* 79: 1197-1203.
- Tomonaga, K., Kobayashi, T., Ikuta, K. (2002). Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* 4: 491–500.
- Tsujimura K., Yamanaka T., Kondo T., Fukushi H., Matsumura T. (2006). Pathogenicity and immunogenicity of Equine herpesvirus type 1 mutants defective in either gI or gE gene in murine and hamster models. *Virology* 68 (10): 1029-1038.
- Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes M, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB (eds) (2000). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, New York San Diego.
- Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, DeRisi JL. (2002). Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci*; 99(24):15687-92.
- Weissenbock H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 8(7):652-6.

SOP

TITOLO1. METODICA MICROARRAY PER IDENTIFICAZIONE EHV, WNV E BDV CAUSA DI FORME NEUROLOGICHE NEGLI EQUINI

TITOLO 2. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Descrivere la procedura per l'allestimento di un esperimento di microarray per l'identificazione di virus causa di forme neurologiche nei cavalli, con riferimento a EHV (*Equid herpesvirus*), WNV (*West Nile virus*) e BDV (*Borna disease virus*). La procedura prevede lo spottaggio delle sonde oligonucleotidiche, l'estrazione del campione, la sua amplificazione mediante PCR e marcatura, l'ibridazione di prodotti di amplificazione di PCR su vetrini microarray precedentemente spottati con sonde oligonucleotidiche. L'ibridazione e la successiva lettura allo scanner permettono di identificare quale virus sia presente nel campione di partenza.

TITOLO 3. DEFINIZIONI

Microarray: metodica che si basa sull'identificazione contemporanea di più geni presenti in un campione. Tale metodica si basa sull'ibridazione di sequenze di acido nucleico del campione con sonde legate a un vetrino e sul rilievo e lettura del segnale di ibridazione.

TITOLO 4. APPARECCHIATURE, MATERIALI E REAGENTI

4.1 Apparecchiature

- Spotter QArray2, Genetix
- Scan Array Express (Perkin Elmer)
- Stufa o termoblocco con adattatore per vetrini
- Centrifuga con adattatore per vetrini
- Termoblocco
- Cappa da PCR o cappa biologica
- Termociclatore
- Apparecchio elettroforesi
- Vaschetta elettroforetica con pettine pozzetti
- Pipette

4.2 Materiali

- Puntali cotonati e non cotonati da 10µl, 100µl e 1.000µl
- Piastra a 384 pozzetti
- Sonde oligonucleotidiche modificate per inserzione di un gruppo amminico all'estremità 5'-terminale (n.1 a n.40).
- Vetrini epossilati Genetix
- Penna per incidere il vetro
- Contenitore chiuso

- Scatolina per conservare i vetrini
- Becker
- Vaschette per l'incubazione in stufa
- Vaschette per i lavaggi dei vetrini
- Falcon da 50 ml
- Rastrello portavetrini per i lavaggi
- Cover slip per microarray per coprire la zona d'ibridazione del vetrino
- Guanti
- Provette da PCR
- Pinzette per vetrini

4.3 Reagenti

- Buffer di spottaggio Genetix (Adva spot 2x)
- Soluzione satura di sale (NaCl)
- Kit estrazione campioni QIAmp Viral RNA (Qiagen)
- Reagenti per allestimento mix RT-PCR (kit Qiagen OneStep RT-PCR)
- Reagenti per allestimento mix PCR: dNTPs, primer, buffer, enzima Taq hot start, MgCl₂
- Reagenti per elettroforesi: agarosio, buffer TBE, bromuro etidio
- SSC 20x
- BSA 10 mg/ml
- SDS 10%
- Acqua da PCR

5. PROCEDIMENTO:

5.1 Spottaggio del vetrino microarray

- Al momento dell'arrivo, risospendere le 40 sonde in un volume adeguato di H₂O da PCR per ottenere una concentrazione di 100µM. Conservare le sonde a -20°C fino al momento dell'uso. L'elenco delle sonde è riportato in allegato 1.
- Scongelare le sonde oligonucleotidiche (n.1 a 40) e aliquotare in ogni pozzetto di una piastra da 384 pozzetti 15µl di ciascuna sonda con l'aggiunta di 15µl di buffer di spottaggio per ottenere una concentrazione 50µM della sonda.
- Prendere il numero di vetrini epossilati necessari per lo spottaggio e numerare nell'angolo in basso a destra il numero del vetrino con la penna per scrivere sul vetro.
- Eseguire la sessione di spottaggio utilizzando lo Spotter QArray2, Genetix per la deposizione delle sonde, alla temperatura controllata di 15°C e con il 60% di umidità.
- Posizionare la piastra con le sonde nello spotter
- Posizionare i vetrini nello spotter
- Utilizzare lo slide design costituito da tre subarray per vetrino (up, mid, bottom), ciascuno con 4 aree per subarray e ciascuna area caratterizzata dalla deposizione di 10 sonde (righe) in 5 repliche (colonne):
es. subarray up

1	A	B	C	D	E
1	•	•	•	•	•
2	•	•	•	•	•
3	•	•	•	•	•
4	•	•	•	•	•
5	•	•	•	•	•
6	•	•	•	•	•
7	•	•	•	•	•
8	•	•	•	•	•
9	•	•	•	•	•
10	•	•	•	•	•

2	A	B	C	D	E
11	•	•	•	•	•
12	•	•	•	•	•
13	•	•	•	•	•
14	•	•	•	•	•
15	•	•	•	•	•
16	•	•	•	•	•
17	•	•	•	•	•
18	•	•	•	•	•
19	•	•	•	•	•
20	•	•	•	•	•

3	A	B	C	D	E
21	•	•	•	•	•
22	•	•	•	•	•
23	•	•	•	•	•
24	•	•	•	•	•
25	•	•	•	•	•
26	•	•	•	•	•
27	•	•	•	•	•
28	•	•	•	•	•
29	•	•	•	•	•
30	•	•	•	•	•

4	A	B	C	D	E
31	•	•	•	•	•
32	•	•	•	•	•
33	•	•	•	•	•
34	•	•	•	•	•
35	•	•	•	•	•
36	•	•	•	•	•
37	•	•	•	•	•
38	•	•	•	•	•
39	•	•	•	•	•
40	•	•	•	•	•

- Richiamare lo slide design “*virus neurologici cv*” o inserire i parametri di start point, di distanza tra le aree del subarray, i pozzetti da cui pescare, indicare in che posizione sono i vetrini, specificare il numero di file e il numero di ripetizioni per ogni sonda, la distanza di ogni spot (500µm), il diametro di ogni spot (150µm).
- Definire il gal file con l’elenco delle sonde che verranno spottate e la posizione delle sonde nel subarray.
- Terminato lo spottaggio, togliere i vetrini dallo spotter e posizionare i vetrini su un supporto in un contenitore chiuso contenente una soluzione satura di sale. Incubare overnight in stufa a 42°C.

5.2 Blocking

Per blocking si intende il bloccaggio di tutti i siti di legame aspecifici e serve per far diminuire l’eventuale rumore di fondo in quanto rende disponibili al legame con il campione (DNA delle PCR) solo le sonde oligonucleotidiche e non i siti aspecifici. Il blocking dipende dal tipo di vetrino in uso, in particolare dalla superficie attiva che c’è sul vetrino, quindi cambia a seconda del vetrino utilizzato.

Dopo aver lasciato il vetrino in incubazione over-night a 42°C in una camerata satura di sale per far aderire meglio le sonde oligonucleotidiche appena spottate, utilizzare il protocollo seguente per vetrini epossilati Genetix:

- Segnare su un foglio dove sono esattamente le regioni del subarray; per fare questo è necessario guardare il vetrino in controluce e segnare sul fianco del vetrino con 1 matita i confini delle diverse regioni. Infine riportare su un foglio lo schema del vetrino indicando le regioni contenenti i diversi subarray. Infatti dopo il blocking gli spot non saranno più visibili in alcun modo e quindi non sarà possibile sapere dove si trovano le diverse regioni di subarray
- Accendere la stufa a 50°C e posizionare un becker con acqua bidistillata
- Posizionare i vetrini in rastrello portavetrini e lavare il vetrino in SDS 0,2 % 5 min a RT
- Lavare in acqua bidistillata finchè non si osservano più bolle
- Immergere i vetrini in acqua bidistillata (pre-riscaldata a 50°C) per 30 min a 50°C
- Asciugare i vetrini in centrifuga a 750rpm per 3 min
- Conservare i vetrini spottati in una scatola per vetrini

5.3 Estrazione del campione

- Estrarre l'acido nucleico del campione (sia che sia necessario estrarre DNA che RNA) con il kit QIAmp Viral RNA (Qiagen) secondo le istruzioni della ditta produttrice.
- Conservare il campione a -20°C fino all'esecuzione delle reazioni di amplificazione.

5.4 Amplificazione e marcatura del campione

- Amplificare i campioni mediante semi-nested PCR o RT-PCR singole per ciascun gene selezionato (EHV: DNA polimerasi e glicoproteina G; WNV: NS5; BDV: p24 e p40) e RT-PCR per la sola regione NS5-3'UTR di WNV, utilizzando il medesimo profilo di amplificazione. Utilizzare per le reazioni esterne il kit one-step RT-PCR (Qiagen) secondo le istruzioni della ditta produttrice, utilizzando i reagenti e profili di amplificazione di seguito riportati in fig.1. Il primer reverse per la reazione RT-PCR di WNV NS5-3'UTR è direttamente marcato con sostanza fluorescente (Cy5), mentre gli altri primer sono normali. Per la reazione nested utilizzare i reagenti e profili di amplificazione riportati in fig. 2. Tutti i primer reverse nested sono marcati con sostanza fluorescente (Cy5).

RT-PCR array cavalli									
NUMERO	RTPCR-n.								
OPERATORE									
DATA									
RAZIONALE	RT-PCR onestep qiagen array cavalli								
Concentrazione stock	Reagente	LOTTO	Condizioni di reazione			Vol (µl)	Campioni	Hypol	
						x reazione	12		12
5 x	buffer		1 x			7	84	Buffer	84
25 mM (nmol/µl)			mM (nmol/µl)			0	0	primer F2	33,6
10 µM (pmol/µl)	primerF (vedi tab)		0,8 µM (pmol/µl)			2,8	33,6	primerF	33,6
10 µM (pmol/µl)	primerR (vedi tab)		0,8 µM (pmol/µl)			2,8	33,6	primerR	33,6
10 mM (each)	dNTPs		0,4 mM (each)		nanomoli	1,4	16,8	dNTPs	16,8
5 U/µl	enzime mix				2 µl (ogni 50µl)	1,4	16,8	enzime mix	16,8
	ddH2O					14,6	175,2	ddH2O	141,6
					Vol parz	30	360		360
ng/µl	DNA		ng/µl			5			
					vol finale	35			
Programma PCR									
50 °C	95 °C	95 °C						primerF	primerR
30min	15min	45sec	72 °C	72 °C				Hypol	SLYP1A
			53 °C	1min	10min				YGDTB
			45sec						QAHNA
								gG	690
								4 °C	1345
								?	
	1x	1x		45x	1x			Flavi NS5	MAMD
								flavi NS53'	EMF1
								VD8 cy5	CFD2
								bdv p24	1327
								bdv p40	2138
									796
Campioni da testare									
n.	campione	estrazione del	n.	campione	estrazione del	n.	campione	estrazione	
1	n. 1		26	n. 2		51	n. 3		
2	n. 2		27	n. 3		52	n. 4		
3	n. 3		28	n. 4		53	n. 5		
4	n. 4		29	n. 5		54	n. 6		
5	n. 5		30	n. 6		55	n. 7		
6	n. 6		31	n. 7		56	n. 8		
7	n. 7		32	n. 8		57	n. 9		
8	n. 8		33	n. 9		58	n. 10		
9	n. 9		34	n. 10		59	C+ BDV p24		
10	n. 10		35	C+ WNV ns5		60	bianco		
11	C+ EHV1 Hypol		36	bianco		61	n.1		
12	bianco		37	n. 1		62	n.2		
13	n. 1		38	n. 2		63	n.3		
14	n. 2		39	n. 3		64	n.4		
15	n. 3		40	n. 4		65	n.5		
16	n. 4		41	n. 5		66	n.6		
17	n. 5		42	n. 6		67	n.7		
18	n. 6		43	n. 7		68	n.8		
19	n. 7		44	n. 8		69	n.9		
20	n. 8		45	n. 9		70	n.10		
21	n. 9		46	n. 10		71	C+ BDV p40		
22	n. 10		47	C+ WNV ns5-3'		72	bianco		
23	C+ EHV1 gG		48	bianco					
24	bianco		49	n.1					
25	n.1		50	n.2					
prodotto atteso bp									
	hvpol est	500							
	hvpolint	200							
	gG est EHV1	555							
	gG int EHV1	534							
	Flavi NS5est	262							
	flavi ns5int	220							
	flavi NS5-3'	800							
	bdv p24est	811							

Fig. 1 Schema reazione, reagenti, profilo termico e prodotti attesi RT-PCR.

PCRNested array cavalli											
NUMERO	PCRN array cv n.										
OPERATORE	sl										
DATA											
RAZIONALE	PCRNested array cavalli										
Concentrazione stock	Reagente	LOTTO	Condizioni di reazione			Vol (µl)	Campioni				
						x reazione	13				
10 x	buffer true start		1 x			3	39 Buffer				
25 mM (nmol/µl)	MgCl2		1,5 mM (nmol/µl)			1,8	23,4 MgCl2				
10 µM (pmol/µl)	primerF		1 µM (pmol/µl)			3	39 primerF				
10 µM (pmol/µl)	primerR		1 µM (pmol/µl)			3	39 primerR				
2 mM (each)	dNTPs		0,4 mM (each)			6	78 dNTPs				
5 U/µl	true start		1,5 U			0,3	3,9 true start				
	ddH2O					10,9	141,7 ddH2O				
						Vol parz	28				
ng/µl	DNA		ng/µl				2				
						vol finale	30				
Programma PCR											
	95°C	95°C	72°C	72°C		Hvpol	primerF	primerR			
	15min	45sec	1min	10min		YG1A	YGD1A	YGD1B cy5			
		53°C	45sec			gG	697	1345 cy5			
						Flavi NS5	FS778	CFD2 cy5			
						flavi NS53'	non nested	non nested			
						bdv p24	1327	1695 cy5			
						bdv p40	1	796 cy5			
		1x		40x	1x						
Campioni da testare											
n.	campione	estrazione del	ng/µl	ratio	note	bp	n.	campione	n.	campione	estrazione
1	n. 1	già RTPCR 1			31	n. 5	già RTPCR 5		61	n. 9	già RTPCR 9
2	n. 2	già RTPCR 2			32	n. 6	già RTPCR 6		62	n. 10	già RTPCR 10
3	n. 3	già RTPCR 3			33	n. 7	già RTPCR 7		63	C+ p40	già RTPCR 11
4	n. 4	già RTPCR 4			34	n. 8	già RTPCR 8		64	bianco	già RTPCR 12
5	n. 5	già RTPCR 5			35	n. 9	già RTPCR 9		65	bianco	
6	n. 6	già RTPCR 6			36	n. 10	già RTPCR 10				
7	n. 7	già RTPCR 7			37	C+ ns5 WNV	già RTPCR 11				
8	n. 8	già RTPCR 8			38	bianco	già RTPCR 12				
9	n. 9	già RTPCR 9			39	bianco					
10	n. 10	già RTPCR 10			40	n. 1	già RTPCR 1				
11	C+ EHV1 Hvpol	già RTPCR 11			41	n. 2	già RTPCR 2				
12	bianco	già RTPCR 12			42	n. 3	già RTPCR 3				
13	bianco				43	n. 4	già RTPCR 4				
14	n. 1	già RTPCR 1			44	n. 5	già RTPCR 5				
15	n. 2	già RTPCR 2			45	n. 6	già RTPCR 6				
16	n. 3	già RTPCR 3			46	n. 7	già RTPCR 7				
17	n. 4	già RTPCR 4			47	n. 8	già RTPCR 8				
18	n. 5	già RTPCR 5			48	n. 9	già RTPCR 9				
19	n. 6	già RTPCR 6			49	n. 10	già RTPCR 10				
20	n. 7	già RTPCR 7			50	C+p24	già RTPCR 11				
21	n. 8	già RTPCR 8			51	bianco	già RTPCR 12				
22	n. 9	già RTPCR 9			52	bianco					
23	n. 10	già RTPCR 10			53	n. 1	già RTPCR 1				
24	C+ EHV1 gG	già RTPCR 11			54	n. 2	già RTPCR 2				
25	bianco	già RTPCR 12			55	n. 3	già RTPCR 3				
26	bianco				56	n. 4	già RTPCR 4				
27	n. 1	già RTPCR 1			57	n. 5	già RTPCR 5				
28	n. 2	già RTPCR 2			58	n. 6	già RTPCR 6				
29	n. 3	già RTPCR 3			59	n. 7	già RTPCR 7				
30	n. 4	già RTPCR 4			60	n. 8	già RTPCR 8				
	prodotto atteso	bp									
	hvpol est	500									
	hvpolint	200									
	gG est EHV1	555									
	gG int EHV1	534									

Fig. 2 Schema reazione, reagenti, profilo termico e prodotti attesi PCR nested,

- Procedere con l'ibridazione dei prodotti di PCR entro 24 ore o conservarli al massimo per due-tre giorni a -20°C fino alla loro analisi.
- Se del caso analizzare i prodotti di PCR mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% e visualizzazione con bromuro di etidio.

5.5 Ibridazione

- Scongelare e portare a temperatura ambiente le provette contenenti le PCR precedentemente preparate e marcate con Cy5.
- Portare a temperatura ambiente la BSA
- Accendere la stufa alla temperatura d'ibridazione stabilita: 48°C
- Accendere il termoblocco a 99°C per la denaturazione delle PCR
- Tirare fuori dalla scatola i vetrini spottati per l'ibridazione
- Segnare a matita sul fianco dei vetrini dove si trovano le aree di sub-array oppure posizionare i vetrini sul foglio dove sono state segnate le zone in cui sono presenti i vari subarray
- Tagliare le cover slip della dimensione idonea per i subarray presenti
- Preparare una vaschetta con del ghiaccio
- Preparare la cameretta adibita all'ibridazione: posizionare all'interno di questa della carta bibula bagnata con acqua distillata semplice o con dell'SSC 2X. Se per l'incubazione si usa invece il termoblocco con l'adattatore per vetrini imbibire nello stesso modo gli appositi filtrini
- Allestire la soluzione d'ibridazione: SDS 0,1%, SSC 2X, BSA 0,2mg/ml.
- Il volume finale è di 30 µl (per le dimensioni dei subarray attualmente in uso); di cui: 20µl di pool PCR + 10 µl di soluzione di ibridazione.

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$$

Stock	Concentrazione finale	Quantità per 1 sub-array	n. X
H ₂ O	H ₂ O	6,1µl	6,1µl x X
SSC 20X	SSC 2X	3µl	3µl x X
SDS 10%	SDS 0,1%	0,3µl	0,3µl x X
BSA 10mg/ml	BSA 0,2 mg/ml	0,6µl	0,6µl x X
PCR 1*		10µl	
PCR 2*		10µ	
Totale		30µl	

* per ogni subarray = subarray up (EHV) PCR1 = DNA polimerasi nested, PCR2 = glicoroteinaG nested; subarray mid (WNV) PCR1 = NS5 (non nested), PCR2= NS5-3'UTR nested; subarray bottom (BDV) PCR1 = p24 nested, PCR2 = p40 nested.

- L'SDS va aggiunto solo dopo aver diluito il sale SSC in acqua, altrimenti è probabile che precipiti, creando problemi di rumore di fondo durante la lettura allo scanner
- Dispensare 10µl di soluzione di ibridazione in provette da PCR sterili

- Aggiungere 20µl di pool PCR ad ogni provetta da PCR contenente la soluzione d'ibridazione
- Denaturare a 99-100°C per 10 minuti, successivamente porre subito in ghiaccio per evitare una rinaturazione
- Preparare i vetrini e le cover-slip da posizionare attorno all'area di ibridazione del subarray (servirsi dei fogli per vedere esattamente dove si trova, oppure segnarsi a matita sul fianco del vetrino le zone dove si trovano le diverse aree).
- Utilizzare un vetrino per ogni campione.
- Dispensare velocemente 25-30 µl della soluzione allestita nella regione dove si trova il subarray specifico, e ricoprire con la cover slip: subarray up pool PCR per EHV, subarray mid pool PCR per WNV, subarray bottom pool PCR per BDV
- Mettere il vetrino nella cameretta adibita all'ibridazione o nel termoblocco (ricordandosi di bagnare la carta bibula o i filtri a seconda che si stia usando la stufa o il termoblocco)
- Incubare in stufa alla temperatura stabilita per il tempo necessario: 3 ore.

Fare attenzione che il vetrino sia assolutamente in piano durante la deposizione della soluzione d'ibridazione e durante l'incubazione; questo è fondamentale per evitare lo scivolamento della soluzione in altre aree d'ibridazione.

Evitare durante tutti i passaggi l'eccessiva esposizione alla luce, soprattutto quella artificiale. Questo potrebbe provocare un decadimento della fluorescenza ed andare a inficiare quindi l'intero esperimento.

- Preparare le soluzioni per i lavaggi; ogni soluzione va in una falcon da 50ml se i vetrini da lavare sono 2, altrimenti si usano delle vaschette adibite ai lavaggi da 250 ml circa

Per un vetrino:

Soluzioni	Tempo e temperatura
Soluzione A = SSC 4X (50ml SSC 20X + 200 H ₂ O)	Per togliere il copri-oggetto Temperatura ambiente
Soluzione B1 = SSC 2X + 0,1%SDS (25ml SSC 20X + 2,5ml SDS 10%+ 222,5 H ₂ O)	5 min Temperatura d'ibridazione (48°C)
Soluzione B2 = SSC 2X + 0,1%SDS (25ml SSC 20X + 2,5ml SDS 10%+ 222,5 H ₂ O)	5 min Temperatura d'ibridazione (48°C)
Soluzione C = SSC 0,2X (2,5ml SSC 20X in 247,5 H ₂ O)	2 min Temperatura ambiente
Soluzione D = SSC 0,1X (1,25ml SSC 20X in 248,75 H ₂ O)	2 min Temperatura ambiente

4. Mettere in stufa durante l'incubazione le soluzioni B1 e B2 affinché si possano scaldare alla temperatura di incubazione (almeno 30 minuti prima della fine dell'incubazione)
5. Alla fine del tempo d'incubazione tirare fuori i vetrini dalla stufa ed estrarli dalla cameretta adibita all'ibridazione facendo attenzione a non toccare in nessun modo il vetrino nelle zone dove è avvenuta l'ibridazione. Per evitare il contatto

con le zone dove è stata allestita l'ibridazione, è buona norma maneggiare i vetrini solo con le pinzette e prenderli dalla parte dove c'è la zigrinatura o dove c'è la scritta che identifica il lato spottato del vetrino (quindi è buona prassi prendere il vetrino con le pinze nella regione più in basso, perché generalmente in quella regione non c'è nessuna area d'ibridazione)

6. Posizionare i vetrini nella rastrelliera adibita ai lavaggi, maneggiarli con le pinzette; oppure se i vetrini sono soltanto 2 e si è deciso di lavarli nelle falcon prestare attenzione a mettere i vetrini schiena-schiene (schiena del vetrino = la parte del vetrino su cui non vi sono spottate le sonde oligonucleotidiche) per evitare che la superficie su cui è stata allestita l'ibridazione si rovini entrando in contatto con un altro vetrino
7. Immergere la rastrelliera contenente i vetrini nelle vaschette adibite ai lavaggi, secondo lo schema indicato nella tabella sopra; oppure immergere i vetrini nelle falcon maneggiandoli sempre e solo con le pinzette
8. Asciugare i vetrini a 750 rpm per 3 minuti posizionandoli nell'apposito contenitore da centrifuga
9. Conservare i vetrini in scatola e effettuare la scansione entro 24 ore.

5.6 Scansione vetrini ibridati

La seguente procedura descrive l'uso dello scanner Scan Array Express.

- Accendere lo scanner Scan Array Express, aspettare 1 minuto, verificare che si accendano le 2 luci verdi
- Cliccare su Scan Array Express
- Cliccare su laser 1 e laser 3 per attuare il riscaldamento dei laser (da blu diventano gialli durante il riscaldamento e dopo 15 minuti, quando sono pronti diventano verdi). Teoricamente si può usare solo 1 laser, quello che eccita il fluoroforo in uso
- Verificare che il rettangolo con scritto instrument status sia verde e connesso, mentre il rettangolo con scritto interlock deve essere verde e closed
- Cliccare su scan, scegliere la modalità easyscan oppure scan protocol se è stato già salvato un protocollo e si vogliono utilizzare le stesse impostazioni
- Selezionare la risoluzione 5µm 10µm 20µm 30µm 50µm; spesso si fa una prima lettura veloce a 50 e poi si scende a 10 per una maggior precisione. Inoltre 10 è la risoluzione alla quale di solito si può effettuare la quantificazione
- Selezionare il fluoroforo e impostare i parametri PMT e Power

Fluorofori	PMT	Power
Cy5	70	90

- PMT si riferisce al guadagno dei fotomoltiplicatori presenti nello scanner; mentre power si riferisce alla potenza del laser in uso. In genere 90 è il parametro massimo sia per PMT che per power.
- Selezionare l'area da guardare e cliccare su scan

- Per visualizzare l'immagine nel miglior modo, si possono aggiustare una serie di parametri; per esempio cliccare su palette e selezionare for both simple and composite images per il colore corrispondente al fluoroforo usato; oppure cliccare su auto adjust per visualizzare l'immagine con il miglior contrasto fra gli spot e il background. Inoltre cliccando su 3x3 median, sempre nello stesso riquadro, è possibile visualizzare l'immagine senza piccoli frammenti di polvere che ci possono essere sul vetrino, in questo modo l'immagine appare più pulita; è una specie di filtro.
- Aggiustare l'intensità del segnale, sia che questo sia saturo (spot bianchi) sia che questo sia troppo debole (spot poco colorati). Cliccare su Configure, tools, linescan, show zoom window; a questo punto posizionare la linea sugli spot e cliccare su ok. Regolare i valori di Power e PMT in modo tale da avere picchi che stiano in un intervallo compreso fra 1.000 e 30-40.000. Infine accettare i nuovi parametri e acquisire l'immagine con i nuovi parametri ricliccando su scan, run scann protocol.
- Per salvare l'immagine elaborata cliccare su file, save as e nomina l'immagine avendo l'accorgimento di salvare l'immagine alla risoluzione di 10 μM in formato Tif e anche in formato jpeg (quest'ultimo per avere le immagini dell'array da conservare).

5.7 Quantificazione

- Cliccare su Scan Array Express (se la quantificazione non viene fatta subito dopo la scansione).
 - Cliccare su open file ed aprire l'immagine voluta.
 - L'immagine deve essere necessariamente salvata con una risoluzione di 10 μm (o meno) in formato Tif. La quantificazione può essere fatta subito dopo la scansione oppure decidere di farla successivamente, anche a distanza di giorni.
 - Cliccare su quantitate; cliccare sulla voce from gal file per porre sull'immagine una griglia che teoricamente è già perfettamente allineata agli spot e che riconosce quale sonda corrisponde ad 1 dato spot. Il gal file è fatto sulla base delle informazioni inserite durante lo spottaggio delle sonde oligonucleotidiche. Nella pratica, anche se si parte dal gal file, la griglia va comunque controllata e adattata agli spot; quindi cliccare su adjust template and register images. In questo modo si apre una finestra che consente di spostare tutta la griglia o anche solo 1 spot in modo da andare a quantificare esattamente dove ci sono gli spot.
- p) Il metodo di normalizzazione del segnale di default nello scanner è Lowess
- Per evitare che la griglia appena posizionata nel modo corretto sugli spot venga spostata, prima di procedere alla quantificazione de-selezionare le voci align subarray e align spots
 - Cliccare su ok. Appare una finestra con tutti i dati relativi a tutti gli spot: media del segnale, mediana del segnale, mediana del background, deviazione standard...
 - Per salvare in excel basta cliccare su view as excel spreadsheet. Oppure cliccare su file, save as in formato csv. Successivamente aprire il formato csv con excel e

ri-salvare come file di excel (questo se ci sono problemi di allineamento dei dati dovuto a versioni differenti di excel)

- Per uscire dal programma cliccare su configure, service features, shot down the instrument and OS
- Spegnerlo scanner e spegnere il computer

5.8 Analisi dei risultati

Il file di excel salvato deve essere analizzato per definire il risultato finale.

- È necessario far calcolare per ogni subarray la media dei valori dei singoli spot per ogni sonda negativa, normalizzare questo dato a 50 e rapportare a questo la media dei valori di intensità di fluorescenza delle singole sonde (positive e negative). Viene considerato positivo un valore di intensità di fluorescenza normalizzato maggiore di 150. Questo criterio interpretativo viene utilizzato per definire la positività di una sonda nel caso di sonde generiche, di specie virale e per WNV di linea genetica e per il primo cluster.
- Per definire un campione positivo per una determinata specie virale è necessaria la presenza di almeno 4 sonde specifiche positive considerate tra quelle “generiche” e quelle di specie virale.
- Nel caso di sonde per i “ceppi” virali è necessario invece effettuare una quantificazione relativa, paragonando i segnali di fluorescenza normalizzati ≥ 150 tra le diverse sonde e considerare come positivo il segnale di fluorescenza normalizzato più elevato.

ALLEGATO 1. Sonde finali per tecnologia microarray

sonda	Gruppo	Virus	Gene	Nome sonda	sequenza sonda 5'-3'
1	EHV	HV var vet	DNApol	HV a varvet DNAp 1 1	CGCGACTGGCTGGC
2	EHV	HV var eq	gG	HV a var eq gG 3 1	CACATGTGCCATGATAGG
3	EHV	EHV1,4	DNApol	EHV1-4 DNAp 6 1(20)	TACGTTCACTMTCGTTGGGC
4	EHV	EHV1	DNApol	EHV1 DNAp 3 2	GCGAGCTGCTGGAGGACAA
5	EHV	EHV1	gG	EHV1 gG 1 1	GGAGGAGTCTAACAGCCCCGA
6	EHV	EHV1	gG	EHV1 gG 1 2	CCCACGTACCCTCAAGTGCTGCA
7	EHV	EHV1 n	DNApol	EHV1neur DNAp 4 2A	CCATCCGTCAACTACTCGA
8	EHV	EHV1 nn	DNApol	EHV1nonneur DNAp 4 2B	ACC ATC CGT CGA CTA CTC
9	EHV	EHV4	DNApol	EHV4 DNAp 2 2	GCCGCAACATGCTTCTCAA
10	EHV	EHV4	DNApol	EHV4 DNAp 3 3	TGGAAACAAACTTCCCAGGGG
11	EHV	EHV4	gG	EHV4 gG 2 1	ACAGCATCCACACGGAAGGG
12	EHV	EHV4	gG	EHV4 gG 4 1	GCATGGCCTCCAAGACTGCGA
13	WNV	Flavi seroJEV	NS5-3UTR	Flavi seroJEV NS5-3UTR 3 1	CAGGAGGACTGGGTTA
14	WNV	Flavi seroJEV	NS5-3UTR	Flavi seroJEV NS5-3UTR 1 1	GTAGACGGTGCTGCCTGCG
15	WNV	WNV 1,2	NS5-3UTR	WNV 1,2 NS5-3UTR 2 2	TGCAGTCTGCATAGTGCC
16	WNV	WNV 1,2	NS5-3UTR	WNV 1,2 NS5-3UTR 4 2	YGTG CCA CTC TGC GGA
17	WNV	WNV 1 all	NS5	WNV 1 all NS5 2 1	CTGCGTGAAGTTGGCACCCG
18	WNV	WNV 1 all	NS5-3UTR	WNV 1 all NS5-3UTR 3 1	GCCCAATGTCAGACCACGC
19	WNV	WNV 2	NS5-3UTR	WNV 2 NS5-3UTR 2 1	TTGAGAATGGAAGTCAGGCCAG
20	WNV	WNV 2	NS5	WNV 2 NS5 2 1	CTT GAA GGA AGT TGG AAC AAA GCC
21	WNV	WNV 1a	NS5	WNV 1a NS5 1 1	CGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTC
22	WNV	WNV 1a A	NS5-3UTR	WNV 1a A NS5-3UTR 6 1	GGAAGTCAGGCCGGAAGTTT
23	WNV	WNV 1a A	NS5	WNV 1a A NS5 2 2	ACTCAGGAGGCGGGGTC
24	WNV	WNV 1a Ano	NS5	WNV 1a Ano NS5 2 1	TCAGGAGGAGGTGTCGAGG
25	WNV	WNV 1a E	NS5-3UTR	WNV 1a E NS5-3UTR 6 1	GGAAGTCAGGCCGGAATAATTT
26	WNV	WNV 1a U	NS5-3UTR	WNV 1a U NS5-3UTR 6 1	GAAAGTCAGGCCGGAAGTTT
27	BDV	BDV all	p40	BDV all p40 3 1	ACAGACTTTGAGTCCCCAGG
28	BDV	BDV all	p40	BDV all p40 4 1	CATGGTGAGACTGCIYACT
29	BDV	BDV all	p24	BDV all p24 1 1	GGAAGAACCCTCCATGATCTC
30	BDV	BDV all	p24	BDV all p24 1 3	CGG AAG GGA GCA GCT RTC G
31	BDV	BDV V,CH	p24	BDV V,CH p24 2 1	CACTCTTGAGACATCTCGGC
32	BDV	BDV CH	p40	BDV CH p40 8 1	GGTAGGCTCCCTTGATTGT
33	BDV	BDV CH	p24	BDV CH p24 3 3	TGT GAT CAC TCC GAC AGC ATC AGA
34	BDV	BDV V	p24	BDV V p24 3 1	GATCCTCGGCGAGAACATCAA
35	BDV	BDV vacc	p24	BDV vacc p24 2 1	CCTTGGGGACATCTCAGCTC
36	BDV	BDV vacc	p24	BDV vacc p24 3 1	CCACTCTGACAGCATCAAATCCTC
n. sonda	Gruppo	Virus	Gene	Nome sonda	sequenza sonda 5'-3'
37	BDV	BDV NO/98	p40	BDV NO98 p40 3 1	TGGAGAGAAGACTACACAACGAGAGC
38	BDV	BDV NO98	p24	BDV NO98 p24 3 2	TGA CAG CAT CAG GGT CCT GGG A
39	BDV	BDV he80	p24	BDV he80 p24 3 1	CCACTCCGATAGCATCAGAATCCTT
40	BDV	BDV RW98	p24	BDV RW98 p24 3 1	CCACTCCGACAGCATCAGAATCCTT

Circuito interlaboratorio su metodi qualitativi di Real Time PCR per il rilevamento dei virus Borna (BDV), Herpes equino tipo 1 (EHV-1) e West Nile (WNV)

Viene di seguito riportato il protocollo operativo relativo all'esecuzione del circuito interlaboratorio per la ricerca contemporanea del genoma dei tre virus oggetto del progetto di ricerca, distribuito ai 17 laboratori nazionali ed internazionali partecipanti.

Materiali forniti ai laboratori

Campioni distribuiti: i campioni sono costituiti da aliquote di omogenato di tessuto nervoso (TN) negativo, aliquote di TN addizionato di virus WN inattivato con β -priolattone ed aliquote di TN di animali infetti da virus EHV-1 e BD. Vengono consegnati: 3 set da 20 campioni contrassegnati con numerazione casuale. Ciascuna provetta contiene 350 μ l di estratto al 10% di tessuto nervoso. Il volume è sufficiente per effettuare 2 estrazioni, per eventuali ripetizioni della prova. L'eluato finale di DNA/RNA estratto per ogni campione è di circa 60 μ l. Gli acidi nucleici estratti devono essere conservati a -80°C e scongelati al momento dell'uso, mantenendoli in ghiaccio o in appositi contenitori refrigerati.

Reagenti

Etichetta	Volume	Descrizione
WND Fw	300 μ l	WND-Fw primer (30 pmol/ μ l)
WND Rv	300 μ l	WND-Rv primer (30 pmol/ μ l)
WND Probe	300 μ l	WND probe (10 pmol/ μ l)
BDV Fw	300 μ l	BDV-Fw primer (30 pmol/ μ l)
BDV Rv	300 μ l	BDV-Rv primer (30 pmol/ μ l)
BDV Probe	300 μ l	BDV probe (10 pmol/ μ l)
EHV-1 Fw	300 μ l	EHV-1-Fw (30 pmol/ μ l)
EHV-1 Rv	300 μ l	EHV-1-Rv (30 pmol/ μ l)
EHV-1 Probe	300 μ l	EHV-1 probe (10 pmol/ μ l)

MANTENIMENTO DEI CAMPIONI: i campioni devono essere conservati a -80°C e dopo il primo scongelamento, devono essere nuovamente posti a -80°C per un periodo massimo di tre settimane. I reagenti devono essere conservati a -20°C e dopo il primo scongelamento devono essere conservati a +4°C per un periodo massimo di tre settimane.

Raccomandazioni generali - I più recenti lavori scientifici escludono la trasmissibilità del virus Borna all'uomo. Inoltre gli allegati alle attuali norme di sicurezza non prevedono l'adozione di particolari misure per la sua manipolazione. Tuttavia, nel raccomandare comunque l'impiego di dispositivi di protezione individuale e l'uso di condizioni di biosicurezza di II livello, per l'effettuazione delle prove previste dal presente protocollo, è necessario avvalersi di personale esperto e qualificato, anche in considerazione della particolare resistenza accertata per il genoma di BDV a livello ambientale e delle conseguenti possibili cross-contaminazioni riscontrate in corso di attività.

Per evitare contaminazioni nell'esecuzione delle prove è pertanto necessario:

Centrifugare i campioni prima dell'apertura delle provette al fine di eliminare la presenza di residui di sospensione di TN dal tappo.

- Se possibile, aprire i campioni utilizzando opener.
- Cambiare frequentemente i guanti monouso durante l'esecuzione delle prove.
- Al termine della lavorazione di ogni panel di campioni, effettuare la decontaminazione di cappe, superfici e materiali d'uso con una soluzione di ipoclorito al 10% (per 30'), eliminando successivamente i residui con acqua.
- Smaltire i materiali di consumo in condizioni di sicurezza.
- Effettuare disinfezioni ambientali con prodotti ad azione virulicida.
-

Materiali e strumenti necessari

- MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plates
- Optical caps or Optical adhesive film
- Micropipette
- Supporti per provette
- Provette tipo Eppendorf DNase/RNase free da 1,5 ml
- Provette tipo Eppendorf DNase/RNase free da 2 ml
- Strumento per Real Time PCR piattaforma Applied Biosystems 7900/7700/7500/7300
- Microcentrifuga
- Vortex
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (per 250 campioni), QIAGEN cod.52906
- Etanolo(96%-100%)
- Acqua grado reagente sterile
- Acqua grado reagente sterile/DEPC

- TaqMan Universal PCR Master Mix, produttore Applied Biosystems cod. 4304437
- TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix, produttore Applied Biosystems cod.4309169

Protocollo

Descrizione

Il protocollo prevede due fasi: la prima di estrazione degli acidi nucleici mediante QIAamp Viral RNA Mini Kit, la seconda di amplificazione di specifiche regioni dei genomi virali considerati e di valutazione qualitativa in termini di presenza/assenza.

Per BDV è stato esaminato un tratto della porzione genomica relativa alla proteina M che con i primers BDV scelti porta ad un prodotto di amplificazione di 74 bp.

Per WNV è stata considerata la porzione genomica codificante per la proteina NS2a che determina, con l'impiego dei primers selezionati, l'amplificazione di una regione di 105 bp.

Per EHV-1, con i primers scelti, l'amplicone comprende una porzione del gene gE di 97 bp.

Le sequenze selezionate per la messa a punto dei metodi saranno descritte nel report finale del progetto di ricerca.

Istruzioni generali

- La procedura richiede di lavorare in condizioni di sterilità.
- Le fasi di estrazione dell'RNA/DNA, preparazione delle miscele di reazione, di manipolazione dell'RNA/DNA e amplificazione devono essere svolte in aree separate.
- Usare puntali per pipette con filtro per evitare cross-contaminazioni.
- Usare guanti monouso e cambiarli frequentemente durante l'esecuzione delle prove.
- Pulire il banco e gli strumenti di lavoro periodicamente con una soluzione di ipoclorito al 10%.
- Le pipette devono essere controllate e tarate regolarmente.
- Impostare le reazioni e distribuire i campioni sulla piastra esattamente come descritto nel protocollo.

Importante: sebbene sia stata fornita una quantità di reagenti e campioni in eccesso, eseguire esclusivamente le tre prove di estrazione ed amplificazione previste. Effettuare le tre prove a distanza di almeno 5 giorni. Usare il materiale in eccesso per ripetere una delle tre prove solo in caso di problemi tecnici (es. errore di estrazione, errore di preparazione della miscela di reazione, errore nel caricamento dei campioni...). Inviare al CERME solo i risultati relativi a tre prove.

Protocollo operativo

Estrazione degli acidi nucleici (DNA ed RNA)

IMPORTANTE - Prima di iniziare l'estrazione:

- aggiungere il Buffer AVL con il Carrier RNA. Eseguire l'operazione secondo le due formule:
- $n \times 0,56 \text{ ml} = y \text{ ml}$; dove n = numero dei campioni ed y = volume necessario di Buffer AVL;
- 2) $y \text{ ml} \times 10 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$; dove z = volume di Carrier RNA da aggiungere al Buffer AVL

Esempio: per 22 campioni occorrono 12,32 ml di Buffer AVL a cui vanno aggiunti 123,2 μl di Carrier RNA.

Il Carrier RNA è liofilizzato e prima del suo impiego va ricostituito con 310 μl con il Buffer AVE.

- aggiungere al Buffer AW1 ed al Buffer AW2 le adeguate quantità di etanolo riportate sulle etichette dei rispettivi Buffer.

- Prelevare 140 μl di campione e dispensarli in una provetta tipo Eppendorf da 1,5/2 ml contenente 560 μl di Buffer AVL con il Carrier RNA
- Agitare con il vortex per 15''
- Incubare a temperatura ambiente (15°C-20°C) per 10 '
- Centrifugare a 5000 rpm per 1' a temperatura ambiente per eliminare le gocce sul tappo della provetta
- Aggiungere 560 μl di etanolo (96%-100%) ed agitare per 15'' con il vortex
- Centrifugare 1' a temperatura ambiente ed a 5000 rpm per eliminare le gocce sul tappo della provetta
- Prelevare 630 μl e porli nella colonnina QIAamp Mini spin inserita nella provetta di raccolta, chiudere il coperchio e centrifugare a 8000 rpm per 1' a temperatura ambiente
- Sostituire la provetta di raccolta con una nuova
- Prelevare il volume rimanente (630 μl) e porlo nella colonnina QIAamp Mini spin, chiudere il coperchio e centrifugare a 8000 rpm per 1' a temperatura ambiente
- Sostituire la provetta di raccolta con una nuova
- Porre attenzione nell'eseguire l'apertura del tappo ed aggiungere alla colonnina QIAamp Mini spin 500 μl di Buffer AW1
- Centrifugare 1' a temperatura ambiente ed a 8000 rpm
- Sostituire la provetta di raccolta con una nuova
- Aggiungere alla colonnina QIAamp Mini spin 500 μl di Buffer AW2, facendo attenzione all'apertura del tappo

- Centrifugare a 14000 rpm (massimo degli rpm) per 3' a temperatura ambiente
- Sostituire la provetta di raccolta con una nuova
- Centrifugare a 14000 rpm per 1' a temperatura ambiente
- Eliminare la provetta di raccolta e porre la colonnina QIAamp Mini spin su di una provetta tipo Eppendorf da 1,5/2 ml
- Aprire il tappo con attenzione, aggiungere alla colonnina QIAamp Mini spin 60 µl di Buffer AVE ed incubare a temperatura ambiente per 1'
- Centrifugare a 8000 rpm per 1' a temperatura ambiente
- Eliminare la colonnina QIAamp Mini spin e conservare gli eluiti a - 80°C.

Amplificazione degli acidi nucleici

Per ogni set di campioni preparare **tre** piastre da 96 pozzetti, rispettivamente una per ogni virus ricercato.

Fase 1: Preparazione delle miscele di reazione

- **Dopo l'uso conservare i reagenti alle temperature consigliate**
- Preparare le miscele di reazione in provette tipo Eppendorf da 2 ml come descritto nelle tabelle. Il volume delle reazioni è calcolato in eccesso per coprire la variabilità del pipettamento dovuto alla viscosità delle soluzioni.

Preparazione della miscela di reazione del sistema BDV per una piastra:

PIASTRA A - stampo ad RNA

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl/reazione	Volume totale µl (80 reazioni)
H ₂ O/DEPC	-	-	4,85	388,00
One step RT PCR 2X Master Mix	2X	1X	12,50	1000,00
40X Multi Scribe	40X	1X	0,65	52,00
Primer BDV Fw	30 pmol/µl	0,90 pmol/µl	0,75	60,00
Primer BDV Rv	30 pmol/µl	0,90 pmol/µl	0,75	60,00
BDV Probe	10 pmol/µl	0,20 pmol/µl	0,5	40,00
		TOT	20 µl	1600,00 µl

*Preparazione della miscela di reazione del sistema WNV per una piastra:
PIASTRA B -stampo ad RNA*

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl/reazione	Volume totale µl (80 reazioni)
H ₂ O/DEPC	-	-	5,35	428,00
One step RT PCR 2X Master Mix	2X	1X	12,50	1000,00
40X Multi Scribe	2X	1X	0,65	52,00
Primer WNV Fw	30 pmol/µl	0,60 pmol/µl	0,50	40,00
Primer WNV Rv	30 pmol/µl	0,60 pmol/µl	0,50	40,00
WNV Probe	10 pmol/µl	0,20 pmol/µl	0,50	40,00
		TOT	20 µl	1600,00 µl

*Preparazione della miscela di reazione del sistema EHV-1 per una piastra:
PIASTRA C -stampo a DNA*

Reagenti	Conc. iniziale	Conc. finale	µl/reazione	Volume totale µl (80 reazioni)
H ₂ O	-	-	6,20	496,00
Universal PCR 2X Master Mix	2X	1X	12,50	1000,00
Primer EHV-1 Fw	30 pmol/µl	0,90 pmol/µl	0,75	60,00
Primer EHV-1 Rv	30 pmol/µl	0,30 pmol/µl	0,25	20,00
EHV-1 Probe	10 pmol/µl	0,12 pmol/µl	0,30	24,00
		TOT	20 µl	1600,00 µl

- Miscelare e centrifugare brevemente.

Fase 2: Allestimento delle reazioni

IMPORTANTE: si deve processare un piastra per volta. Quindi, qui di seguito viene riportato lo schema generale per la preparazione delle tre reazioni di amplificazione: PIASTRA BDV, PIASTRA WNV e PIASTRA EHV-1

- Preparare sotto cappa una provetta tipo eppendorf da 1,5/2 ml per ciascun campione (in totale 21 provette di cui 1 è costituita dal controllo negativo NTC)
- Aggiungere un volume di miscela di reazione pari a 3,5 replicati di PCR: **70 µl** per provetta
- Aggiungere ad ogni provetta un volume di soluzione di DNA/RNA pari a 3,5 replicati di PCR per ciascun campione: **17,5 µl**

- Per gli NTC aggiungere 17,5 µl di acqua grado reagente sterile per EHV –1 e acqua grado reagente sterile/DEPC per i virus ad RNA
- Agitare per almeno 10’’ con il vortex e centrifugare brevemente. Tale passaggio è importante per ridurre al minimo la variabilità tra le ripetizioni di PCR.
- Dispensare 25 µl in ciascun pozzetto della piastra di amplificazione, seguendo lo schema di disposizione dei campioni.
- Applicare la pellicola adesiva (optical adhesive film) o tappi ottici.
- Operare in modo da evitare la formazione di bolle d’aria. Centrifugare brevemente la piastra per l’eventuale rimozione di queste.

PIASTRA A-BDV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	C4	C4	C4
B	C5	C5	C5	C6	C6	C6	C7	C7	C7	C8	C8	C8
C	C9	C9	C9	C10	C10	C10	C11	C11	C11	C12	C12	C12
D	C13	C13	C13	C14	C14	C14	C15	C15	C15	C16	C16	C16
E	C17	C17	C17	C18	C18	C18	C19	C19	C19	C20	C20	C20
F	NTC	NTC	NT									
G												
H												

PIASTRA B-WNV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	C4	C4	C4
B	C5	C5	C5	C6	C6	C6	C7	C7	C7	C8	C8	C8
C	C9	C9	C9	C10	C10	C10	C11	C11	C11	C12	C12	C12
D	C13	C13	C13	C14	C14	C14	C15	C15	C15	C16	C16	C16
E	C17	C17	C17	C18	C18	C18	C19	C19	C19	C20	C20	C20
F	NTC	NTC	NTC									
G												
H												

PIASTRA C-EHV-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	C1	C1	C2	C2	C2	C3	C3	C3	C4	C4	C4
B	C5	C5	C5	C6	C6	C6	C7	C7	C7	C8	C8	C8
C	C9	C9	C9	C10	C10	C10	C11	C11	C11	C12	C12	C12
D	C13	C13	C13	C14	C14	C14	C15	C15	C15	C16	C16	C16
E	C17	C17	C17	C18	C18	C18	C19	C19	C19	C20	C20	C20
F	NTC	NTC	NTC									
G												
H												

Fase 3: Programmazione dello strumento

Accendere l'amplificatore almeno 30 ' prima dell'esecuzione della prova.

IMPORTANTE: è consigliato effettuare una corsa alla volta. Viene riportato lo schema generale per l'impostazione delle corse: PIASTRA BDV, PIASTRA WNV e PIASTRA EHV-1

- ❖ Programmazione dei detector:
 1. **BDV e WNV reporter FAM e quencher TAMRA**
 2. **EHV-1 reporter FAM e quencher NON FLUORESCENT**
 - ❖ **ROX è il "passive reference dye"**
 - ❖ Selezionare tutti i campioni come "unknown" ed utilizzare i codici di identificazione indicati per i differenti set di campioni
 - ❖ Impostare il volume di miscela di reazione a 25 µl
 - ❖ Impostare lo strumento in modalità "standard"
 - ❖ Impostare le condizioni di reazione come riportato di seguito:

PIASTRA BDV e PIASTRA WNV

Step	Stage	T (°C)	Tempo (sec.)	Acquisizione	cicli
1	Retrotrascrizione	48°C	1.800''	NO	1
2	Attivazione Taq Pol.	95°C	600''	NO	1
3a	Denaturazione	95 °C	15''	NO	40
3b	Annealing e sintesi	60 °C	60''	SI	

PIASTRA EHV-1

Step	Stage	T (°C)	Tempo (sec.)	Acquisizione	cicli
1	UNG (se disponibile)	50°C	120''	NO	1
2	Denaturazione iniz.	95 °C	600''	NO	1
3a	Denaturazione	95 °C	15''	NO	40
3b	Annealing e sintesi	60 °C	60''	SI	

- ❖ Salvare la corsa riportando rispettivamente nell'ordine: virus ricercato, numero corrispondente al set di campioni in esame, identificativo del laboratorio assegnato (es. BDV_set1_lab_12.sds)
- ❖ Introdurre la piastra nello strumento e avviare la corsa.

Fase 4: Analisi dei dati

Al termine dell'amplificazione procedere all'analisi della corsa come descritto di seguito, analizzando separatamente le tre piastre (PIASTRA BDV,PIASTRA WNV e PIASTRA EHV-1):

- Calibrare manualmente la linea di soglia in modo che tagli le curve di amplificazione positive nella zona in cui assumono un andamento stabilmente logaritmico
- impostare la linea di base 3 cicli prima del più basso Ct positivo ottenuto
- Salvare le impostazioni ed esportare i dati su file excel.

IL PROCESSO DI VALUTAZIONE

Valutazione della accuratezza intra-laboratorio e inter-laboratorio

L'accuratezza rappresenta lo scostamento tra il risultato di una prova ed il valore di riferimento, e può anche essere espressa da sensibilità e specificità per i metodi che forniscono risultati qualitativi (ISO 5725-1).

La specificità e la sensibilità analitica possono essere valutate, nel caso di prove qualitative, effettuando una serie di prove su campioni noti (per i quali cioè si conosca lo stato di effettiva positività o negatività per l'analita ricercato).

E' stata quindi calcolata la Specificità (Sp) per ogni laboratorio e la Specificità Complessiva dei 17 laboratori rispetto al valore di riferimento negativo (true status dei campioni)

E' stata calcolata la Sensibilità (Se) virus-specifica per ogni laboratorio considerando i risultati forniti per le tre sedute indipendenti e complessiva dei 17 rispetto al valore di riferimento positivo per ciascuno dei 3 virus (true status dei campioni)

E' stata quindi calcolata l'accuratezza complessiva dei risultati forniti da ciascun laboratorio, sia considerando separatamente i 3 virus, sia considerando la diagnosi simultanea ai 3 virus.

Per la verifica dell'accuratezza della rete dei laboratori tali valutazioni sono state condotte separatamente sia per laboratorio (considerando $20 \times 3 = 60$ determinazioni), sia sulla serie di risultati forniti dai 17 partecipanti al circuito ($60 \times 17 = 1.020$ determinazioni).

Classificazione dei risultati - accuratezza

I risultati sono stati classificati soddisfacenti in caso di accuratezza pari a 100% .

Valutazione della precisione intra-laboratorio e inter-laboratorio (ripetibilità e riproducibilità)

La precisione è la concordanza dei valori ottenuti da una serie di misurazioni effettuate nelle medesime condizioni e comprende: ripetibilità e riproducibilità. La ripetibilità esprime la concordanza fra valori ottenuti da prove indipendenti condotte, nello stesso laboratorio, in un breve intervallo di tempo ed utilizzando gli stessi materiali, metodi ed apparecchiature. La riproducibilità esprime la concordanza fra valori ottenuti da prove

indipendenti utilizzando lo stesso metodo, lo stesso materiale, ma in laboratori diversi, e con apparecchiature ed operatori diversi (ISO 3534-1).

L'indice di concordanza più semplice è rappresentato dalla proporzione di repliche concordi (positive e negative) rispetto al totale delle repliche effettuate, ossia considerando una tabella 2x2:

$$C = \frac{A + D}{N}$$

Questo indicatore non tiene conto, tuttavia, delle concordanze che si verificano per puro effetto del caso. Un metodo per valutare la ripetibilità intralaboratorio o la riproducibilità interlaboratorio attraverso la valutazione della concordanza, depurata dell'effetto del caso, è il calcolo dell'indice K di Cohen.

Ripetibilità Intra-laboratorio

La concordanza complessiva rispetto ai campioni di riferimento negativi e positivi, a livello intra-laboratorio (60 determinazioni) è stata valutata mediante calcolo dell'Indice K, ossia operando un rapporto tra i risultati concordanti non dovuti al caso ed il numero massimo di risultati non dovuti al caso (K) (Fleiss 1981; Altman 1991) attraverso le seguenti formule:

$$K = \frac{\text{n}^\circ \text{ accordi osservati} - \text{n}^\circ \text{ accordi dovuti al caso}}{\text{n}^\circ \text{ totale campioni} - \text{n}^\circ \text{ accordi dovuti al caso}}$$

Ovvero, considerando una classica tabella 2x2:

$$K_1 = \frac{(a+d) - \{[(a+b)(a+c) / N] + [(c+d)(b+d) / N]\}}{(a+b+c+d) - \{[(a+b)(a+c) / N] + [(c+d)(b+d) / N]\}}$$

Per ciascun laboratorio (60 determinazioni) sono quindi state calcolate 4 statistiche K di Cohen.

Diagnosi virus-specifica

- K per WNDV (51 negativi – 9 positivi)
- K per EHV-1 (48 negativi – 12 positivi)
- K per BDV (51 negativi – 9 positivi)

Diagnosi simultanea

- K per WNDV+EHV-1+BDV (30 negativi – 30 positivi)

K può assumere un valore massimo pari a **1** in caso di concordanza completa, a **0** in caso di concordanza equivalente a quella attesa per effetto del caso, e può assumere un **valore**

negativo in caso di concordanza inferiore rispetto a quella che si realizzerebbe per casualmente.

La valutazione del grado di accordo attraverso il calcolo del valore K può essere esteso anche a situazioni in cui sono presenti più operatori e/o più categorie di risultato.

In questo caso sono stati calcolati, a livello intra-laboratorio, gli accordi casuali attesi per ciascuna categoria di risultato (Negativo, Positivo), separatamente per ciascun virus e complessivamente per la diagnosi simultanea dei tre virus.

La somma degli accordi attesi costituisce il numero massimo complessivo di accordi attesi per l'effetto del caso (P_e).

Sottraendo alla percentuale di accordi complessivamente osservati (P_0) per i tre virus separatamente e simultaneamente, la percentuale di accordi dovuti al caso (P_e), si ottiene la percentuale di accordi non dovuti al caso ($P_0 - P_e$).

Considerando che il massimo livello di accordo possibile è pari a 1, sottraendo a 1 la percentuale di accordi dovuti al caso (P_e), si ottiene la proporzione massima possibile di accordi non dovuti al caso ($1 - P_e$), ossia il denominatore delle formula di K.

Quindi per il calcolo di K è stata applicata la seguente formula:

$$K = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

Classificazione dei risultati - ripetibilità

I risultati sono stati classificati soddisfacenti per valori di K di Cohen > 0,8 .

Riproducibilità inter-laboratorio

La riproducibilità inter-laboratorio è stata ottenuta mediante calcolo del K MULTIPLIO (Fleiss, 1981): in questo caso è stato calcolato il grado di concordanza complessiva ottenuta dalla rete dei laboratori rispetto ai risultati attesi. Anche in questo caso, i calcoli sono stati effettuati separatamente per ciascun virus e complessivamente per la diagnosi simultanea dei tre virus.

A tal fine è stata adottata la seguente formula:

$$K_{m1} / K_{m2} = \frac{\sum (P_0 - P_e)_{ii}}{\sum (1 - P_e)_{ii}}$$

dove al numeratore ed al denominatore vengono poste, rispettivamente, la somma di ($P_0 - P_e$) e la somma di ($1 - P_e$) dei 17 laboratori, ottenute al calcolo della ripetibilità intra-laboratorio.

Classificazione dei risultati - riproducibilità

I risultati sono stati classificati soddisfacenti per valori di K di Cohen > 0,8 .

Interpretazione del valore di K

In bibliografia sono riportati diversi criteri di valutazione del valore di K ottenuto dalle prove di laboratorio; qui di seguito viene proposta la tabella di valutazione di Landis e Kock (1977):

Valore di Kappa	Grado di accordo
<0	Poor (No better than chance)
0,0-0,2	Slight
0,21-0,4	Fair
0,41-0,6	Moderate
0,61-0,8	Substantial
0,8-1	Almost perfect

RISULTATI

Valutazione della accuratezza intra-laboratorio

I risultati della prova di valutazione della accuratezza intralaboratorio sono riportati di seguito per i 17 Laboratori. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

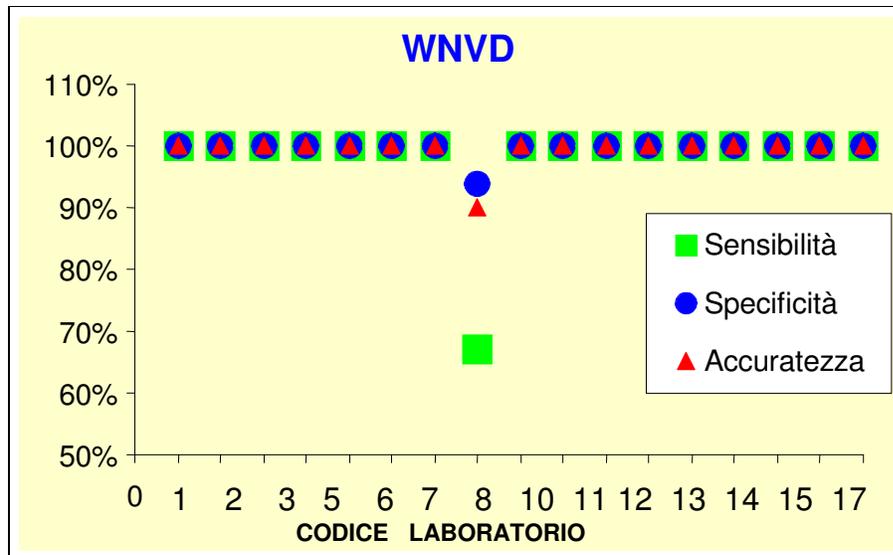
WNDV

Nella tabella 1 e nel grafico 1 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per WNDV

Tabella 1: WNVD Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Sensibilità</i>	<i>Specificità</i>	<i>Accuratezza</i>
<i>1</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>2</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>3</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>5</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>6</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>7</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>8</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>10</i>	<i>0,67%</i>	<i>0,94%</i>	<i>0,90%</i>
<i>11</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>12</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>13</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>14</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>15</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>17</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>18</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>19</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>20</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>

Figura 1: WNVD Accuratezza intra-laboratorio.
Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



16 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100%

Il Laboratorio 10 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 6 campioni di riferimento (3 positivi e 3 negativi): in particolare il laboratorio ha fornito 3 risultati falsamente positivi e 3 risultati falsamente negativi.

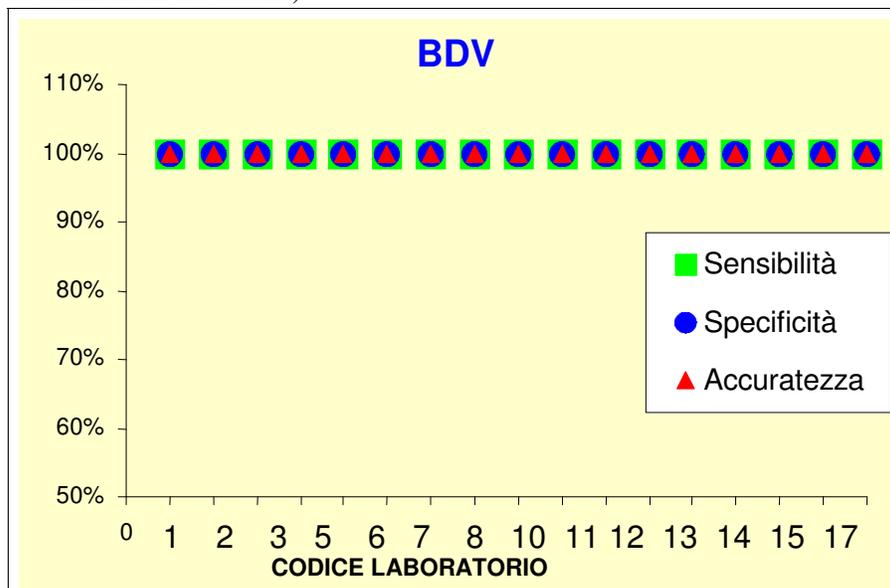
BDV

Nella tabella 2 e nel grafico 2 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per BDV. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 2: BDV Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Sensibilità</i>	<i>Specificità</i>	<i>Accuratezza</i>
<i>1</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>2</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>3</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>5</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>6</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>7</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>8</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>10</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>11</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>12</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>13</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>14</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>15</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>17</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>18</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>19</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>20</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>

Figura 2: BDV Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



17 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100%

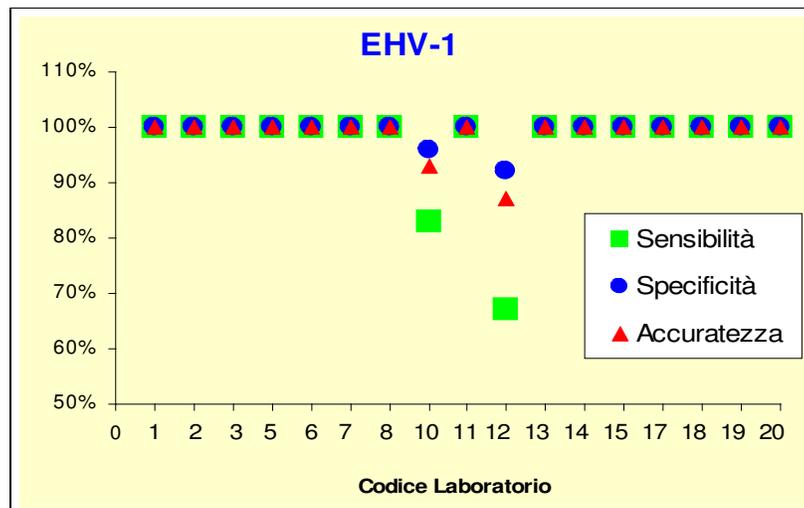
EHV-1

Nella tabella 3 e nel grafico 3 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per EHV-1. Per questa diagnosi il panel era costituito da 16 campioni negativi e 4 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 3: EHV-1 Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Sensibilità</i>	<i>Specificità</i>	<i>Accuratezza</i>
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	100%	100%	100%
5	100%	100%	100%
6	100%	100%	100%
7	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%
10	0,83%	0,96%	0,93%
11	100%	100%	100%
12	0,67%	0,92%	0,87%
13	100%	100%	100%
14	100%	100%	100%
15	100%	100%	100%
17	100%	100%	100%
18	100%	100%	100%
19	100%	100%	100%
20	100%	100%	100%

Tabella 3: EHV-1 Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



15 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100%

Il Laboratorio 10 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 4 campioni di riferimento (2 positivi e 2 negativi): in particolare il laboratorio ha fornito 2 risultati falsamente positivi e 2 risultati falsamente negativi.

Il Laboratorio 12 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 8 campioni di riferimento (4 positivi e 4 negativi): in particolare il laboratorio ha fornito 4 risultati falsamente positivi e 4 risultati falsamente negativi.

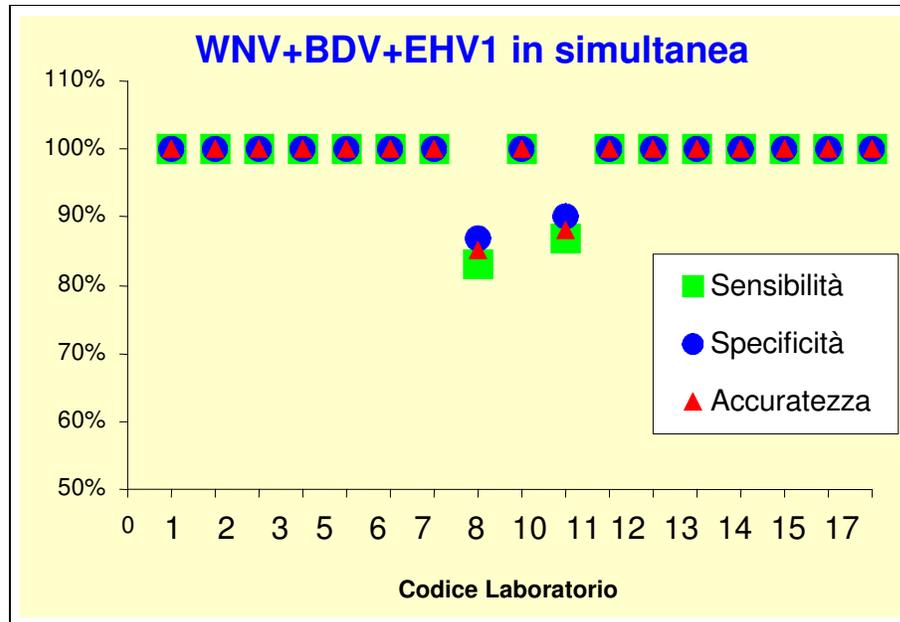
DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Nella tabella 4 e nel grafico 4 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti considerando simultaneamente (in parallelo) i risultati forniti per WNDV + EHVI-1 + BDV nelle 3 sedute indipendenti. Per questa diagnosi il panel era costituito da 10 campioni negativi e 10 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 4: Diagnosi simultanea WNDV + EHVI-1 + BDV : Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Sensibilità</i>	<i>Specificità</i>	<i>Accuratezza</i>
<i>1</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>2</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>3</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>5</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>6</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>7</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>8</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>10</i>	<i>0,83%</i>	<i>0,87%</i>	<i>0,85%</i>
<i>11</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>12</i>	<i>0,87%</i>	<i>0,90%</i>	<i>0,88%</i>
<i>13</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>14</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>15</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>17</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>18</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>19</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>
<i>20</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>	<i>100%</i>

Figura 4: Diagnosi simultanea WNDV + EHVI-1 + BDV : Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



15 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100% per la diagnosi in simultanea WNDV + EHVI-1 + BDV

Il Laboratorio 10 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 6 campioni di riferimento (3 positivi e 3 negativi) per WNV e di 4 campioni di riferimento (2 positivi e 2 negativi) per EHV-1. il laboratorio ha complessivamente fornito 5 risultati falsamente positivi e 5 risultati falsamente negativi.

Il Laboratorio 12 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 8 campioni di riferimento (4 positivi e 4 negativi) per EHV-1: in particolare il laboratorio ha fornito 4 risultati falsamente positivi e 4 risultati falsamente negativi.

Si segnala tuttavia che i 2 laboratori con accuratezza non soddisfacente non hanno fatto rilevare l'esistenza di aspecificità crociate tra i 3 virus oggetto di diagnosi.

Valutazione della Precisione (Ripetibilità) intra-laboratorio

I risultati della valutazione del grado di accordo (K di Cohen) rispetto al valore di riferimento basato sul criterio di classificazione di Landis e Kock sono riportati nelle tabelle e figure seguenti.

WNDV

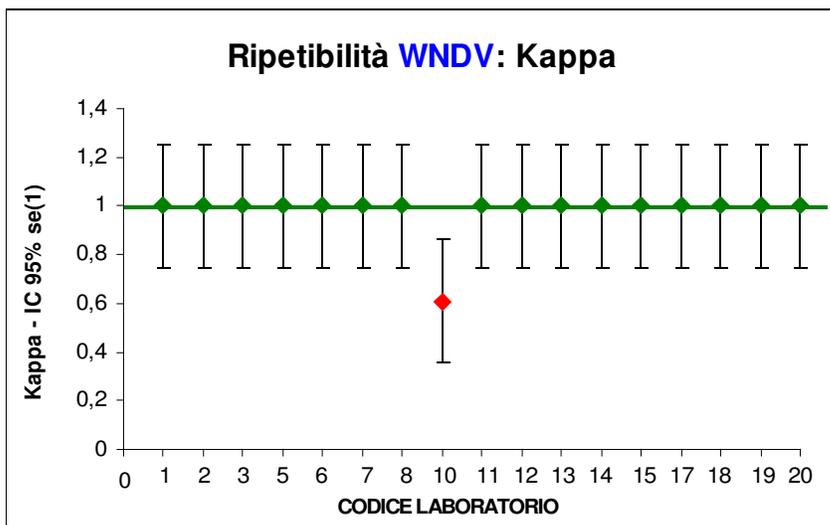
Nella tabella 5 e nel grafico 5 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per WNDV. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 5: WNDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

Codice Laboratorio	Kappa	IC 95% - limits - Se(1)	
		lower	upper
1	1	0,747	1,253
2	1	0,747	1,253
3	1	0,747	1,253
5	1	0,747	1,253
6	1	0,747	1,253
7	1	0,747	1,253
8	1	0,747	1,253
10	0,61	0,36	0,86
11	1	0,747	1,253
12	1	0,747	1,253
13	1	0,747	1,253
14	1	0,747	1,253
15	1	0,747	1,253
17	1	0,747	1,253
18	1	0,747	1,253
19	1	0,747	1,253
20	1	0,747	1,253

ripetibilità non soddisfacente

Figura 5: WNDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock



16 laboratori su 17 hanno mostrato una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi di WNDV, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

Il Laboratorio 10 ha fornito un esito NON SODDISFACENTE alla valutazione della precisione intralaboratorio, mostrando una ripetibilità scarsa dei risultati ottenuti nelle 3 sedute indipendenti sugli stessi campioni.

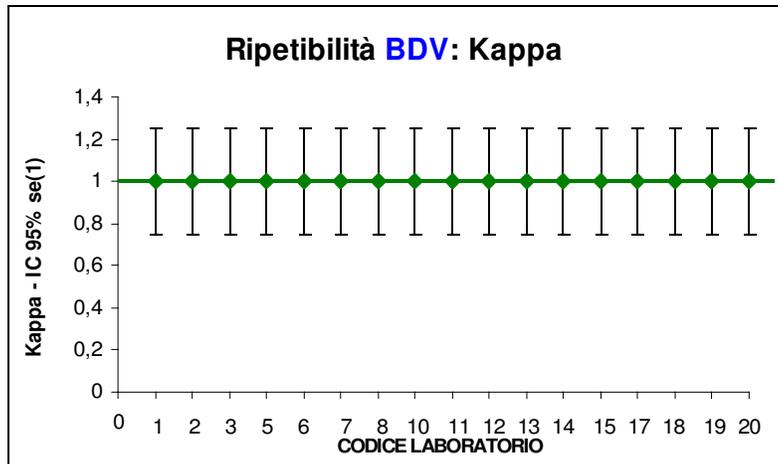
3.2.2. BDV

Nella tabella 6 e nel grafico 6 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per BDV. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 6: BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Kappa</i>	<i>IC 95% - limits - Se(1)</i>	
		<i>lower</i>	<i>upper</i>
<i>1</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>2</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>3</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>5</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>6</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>7</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>8</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>10</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>11</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>12</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>13</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>14</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>15</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>17</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>18</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>19</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>
<i>20</i>	<i>1</i>	<i>0,747</i>	<i>1,253</i>

Figura 6: BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)



17 laboratori su 17 hanno ottenuto una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi di BDV, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

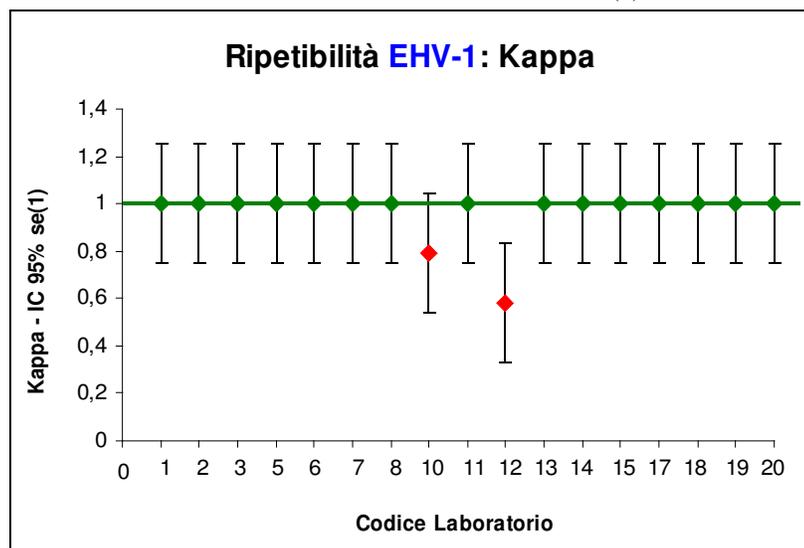
EHV-1

Nella tabella 7 e nel grafico 7 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per EHV-1. Per questa diagnosi il panel era costituito da 16 campioni negativi e 4 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 7: EHV-1: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Kappa</i>	<i>IC 95% - limits - Se(1)</i>		
		<i>lower</i>	<i>upper</i>	
1	1	0,747	1,253	
2	1	0,747	1,253	
3	1	0,747	1,253	
5	1	0,747	1,253	
6	1	0,747	1,253	
7	1	0,747	1,253	
8	1	0,747	1,253	
10	0,79	0,54	1,05	ripetibilità non soddisfacente
11	1	0,747	1,253	
12	0,58	0,33	0,84	ripetibilità non soddisfacente
13	1	0,747	1,253	
14	1	0,747	1,253	
15	1	0,747	1,253	
17	1	0,747	1,253	
18	1	0,747	1,253	
19	1	0,747	1,253	
20	1	0,747	1,253	

Figura 7: EHV-1: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)



15 laboratori su 17 hanno mostrato una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi di EHV-1, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

Il Laboratorio 10 ed il laboratorio 12 hanno fornito un esito NON SODDISFACENTE alla valutazione della precisione intralaboratorio, mostrando una ripetibilità scarsa dei risultati ottenuti nelle 3 sedute indipendenti sugli stessi campioni.

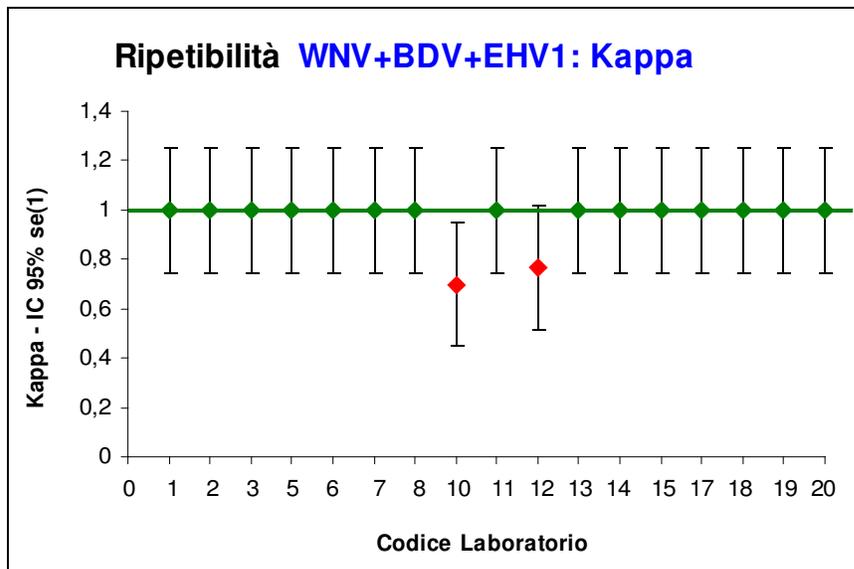
DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Nella tabella 8 e nella figura 8 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti considerando simultaneamente (in parallelo) i risultati forniti per WNDV + EHVI-1 + BDV nelle 3 sedute indipendenti. Per questa diagnosi il panel era costituito da 10 campioni negativi e 10 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 8: Diagnosi simultanea (in parallelo) WNDV + EHVI-1 + BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

<i>Codice Laboratorio</i>	<i>Kappa</i>	<i>IC 95% - limits - Se (1)</i>		
		<i>lower</i>	<i>upper</i>	
1	1	0,747	1,253	
2	1	0,747	1,253	
3	1	0,747	1,253	
5	1	0,747	1,253	
6	1	0,747	1,253	
7	1	0,747	1,253	
8	1	0,747	1,253	
10	0,70	0,45	0,95	<i>ripetibilità non soddisfacente</i>
11	1	0,747	1,253	
12	0,77	0,51	1,02	<i>ripetibilità non soddisfacente</i>
13	1	0,747	1,253	
14	1	0,747	1,253	
15	1	0,747	1,253	
17	1	0,747	1,253	
18	1	0,747	1,253	
19	1	0,747	1,253	
20	1	0,747	1,253	

Figura 8: Diagnosi simultanea (in parallelo) WNDV + EHVI-1 + BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)



15 laboratori su 17 hanno mostrato una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi simultanea (in parallelo) WNDV + EHVI-1 + BDV, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

Il Laboratorio 10 ed il laboratorio 12 hanno fornito un esito NON SODDISFACENTE alla valutazione della ripetibilità intralaboratorio, mostrando un grado di accordo rispetto ai risultati attesi inferiore ai parametri richiesti.

Valutazione generale Intra-laboratorio: Accuratezza e Ripetibilità

Nella tabella 9 sono riportati i risultati complessivi della valutazione intra-laboratorio: accuratezza e ripetibilità.

Tabella 9: Diagnosi singola e simultanea (in parallelo) per WNDV EHV-1 BDV: riassunto dei giudizi su accuratezza e ripetibilità (precisione intralaboratorio) per i 17 laboratori partecipanti

Codice laboratorio	WNDV		BDV		EHV1		WNDV+BDV+EHV-1 simultanea	
	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza
1*	+	+	+	+	+	+	+	+
2*	+	+	+	+	+	+	+	+
3*	+	+	+	+	+	+	+	+
5*	+	+	+	+	+	+	+	+
6*	+	+	+	+	+	+	+	+
7*	+	+	+	+	+	+	+	+
8*	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	-	-	-	-
11*	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	-	-	-	-
13*	+	+	+	+	+	+	+	+
14*	+	+	+	+	+	+	+	+
15*	+	+	+	+	+	+	+	+
17*	+	+	+	+	+	+	+	+
18*	+	+	+	+	+	+	+	+
19*	+	+	+	+	+	+	+	+
20*	+	+	+	+	+	+	+	+

15 laboratori su 17 hanno mostrato **risultati soddisfacenti** alla valutazione dell'accuratezza e della precisione intra-laboratorio, in virtù di una sensibilità ed una specificità pari al 100%, ed hanno mostrato una elevata ripetibilità dei risultati, sia per le singole diagnosi sia per la diagnosi simultanea ai 3 virus.

L10, ha fornito risultati non soddisfacenti alla prova di accuratezza per la singola diagnosi di WNDV e EHV-1 e conseguentemente anche alla diagnosi simultanea (in parallelo) per i 3 virus, avendo evidenziato problemi di sensibilità non trascurabili ed alcune classificazioni errate di campioni negativi come positivi. Per questo laboratorio si raccomanda di adottare tutte le azioni ed i controlli necessari ad evitare le eventuali cross-contaminazioni, che possono aver determinato l'esito non soddisfacente complessivo alla valutazione intra-laboratorio. In particolare, i risultati forniti dal laboratorio lasciano ipotizzare che siano occorsi errori grossolani nella esecuzione delle prove.

L12 ha fornito risultati non soddisfacenti alla prova di accuratezza e ripetibilità per la diagnosi di EHV-1 avendo mostrato problemi di specificità e sensibilità, particolarmente inattesi in RT-PCR, legati alla errata classificazione di campioni positivi come negativi. Questi risultati hanno determinato un esito non soddisfacente anche alla prova di

ripetibilità alla diagnosi simultanea per i 3 virus. La valutazione intra-laboratorio complessiva è quindi non soddisfacente. Anche in questo caso, come per il L10 la misclassificazione di campioni di riferimento negativi e positivi per BDV potrebbe essere legata ad errori grossolani nell'esecuzione delle prove.

Valutazione della accuratezza inter-laboratorio

Nonostante il risultato non soddisfacente fornito da alcuni laboratori alla valutazione intralaboratorio, la valutazione di accuratezza della rete dei laboratori e di riproducibilità (precisione inter-laboratorio) risulta soddisfacente.

Le tabelle 10-13 riportano nel dettaglio le concordanze assolute osservate tra i valori di riferimento ed i risultati osservati nell'insieme dei 17 laboratori (1.020 determinazioni), rispettivamente per categorie per la singola diagnosi e per la diagnosi simultanea (in parallelo) dei 3 virus.

WNDV

Tabella 10. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi di **WNDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

		<i>Valore atteso (riferimento)</i>		<i>totale righe</i>
		<i>pos+</i>	<i>neg</i>	
<i>esiti ottenuti</i>	<i>pos+</i>	<i>150</i>	<i>3</i>	<i>153</i>
	<i>neg</i>	<i>3</i>	<i>864</i>	<i>867</i>
<i>Totale colonne</i>		<i>153</i>	<i>867</i>	<i>1020</i>

<p>Se = 98,4% (150/153) Sp = 99,65% (864/867) A = 99.4% (1014/1020)</p>
--

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi di WNDV è SODDISFACENTE. Sensibilità e Specificità non raggiungono il 100% a causa dei problemi di accuratezza mostrati dal Laboratorio 10.

BDV

Tabella 11. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi di **BDV** (17 laboratori, 1.020determinazioni).

		<i>Valore atteso (riferimento)</i>		<i>totale righe</i>
		<i>pos+</i>	<i>neg</i>	
<i>esiti ottenuti</i>	<i>pos+</i>	153	0	153
	<i>neg</i>	0	867	867
<i>Totale colonne</i>		153	867	1020

<p>Se = 100% (150/150) Sp = 100% (867/867) A = 100% (1020/1020)</p>
--

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi di BDV è SODDISFACENTE. Sensibilità e Specificità raggiungono il 100%.

EHV-1

Tabella 12. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi di **EHV-1** (17 laboratori, 1.020determinazioni).

		<i>Valore atteso (riferimento)</i>		<i>totale righe</i>
		<i>pos+</i>	<i>neg</i>	
<i>esiti ottenuti</i>	<i>pos+</i>	198	6	204
	<i>neg</i>	6	810	816
<i>Totale colonne</i>		204	816	1020

<p>Se = 97,06% (198/204) Sp = 99,26% (810/816) A = 98.82% (1008/1020)</p>
--

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi di EHV-1 è SODDISFACENTE. Tuttavia i problemi di Sensibilità complessiva (97,06%) sono particolarmente inattesi in RT-PCR.

Si rileva tuttavia che il risultato complessivo è fortemente influenzato dalla scarsa accuratezza dimostrata da 2 laboratori (L10 e L12) nei quali sono presumibilmente intersorsi errori grossolani nella esecuzione delle prove.

DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Tabella 13. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

		Valore atteso (riferimento)		totale righe
		pos+	neg	
esiti ottenuti	pos+	501	9	510
	neg	9	501	510
Totale colonne		510	510	1020

<p>Se = 98,24% (501/510) Sp = 98,24% (501/510) A = 98,24% (1002/1020)</p>
--

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi simultanea di **WNDV + EHVI-1 + BDV** è SODDISFACENTE.

Si ribadisce tuttavia che il mancato raggiungimento di una accuratezza pari al 100% è fortemente influenzato dalla scarsa accuratezza dimostrata da 2 laboratori (L10 e L12") nei quali sono presumibilmente intercorsi errori grossolani nella esecuzione delle prove.

Valutazione della Precisione (Riproducibilità) inter-laboratorio

Di seguito viene riportato il calcolo dell'indice di concordanza depurato dall'effetto del caso (Kappa di Cohen - Kappa multiplo) osservato nell'insieme dei 17 laboratori (1.020 determinazioni), rispettivamente per categorie per la singola diagnosi e per la diagnosi simultanea (in parallelo) dei 3 virus.

WNDV

Tabella 14. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi di **WNDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	864	$(867*867)/1020=736,95$
accordi pos+	150	$(153*153)/1020=22,95$
totale accordi	1014	$736,95+22,95=759,9$

[^] cfr. tabella 10

Tabella 15. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi di **WNDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,235}{4,335} = 0,97$$

Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,745	0,255	0,255
2	1	0,745	0,255	0,255
3	1	0,745	0,255	0,255
5	1	0,745	0,255	0,255
6	1	0,745	0,255	0,255
7	1	0,745	0,255	0,255
8	1	0,745	0,255	0,255
10	0,9	0,745	0,155	0,255
11	1	0,745	0,255	0,255
12	1	0,745	0,255	0,255
13	1	0,745	0,255	0,255
14	1	0,745	0,255	0,255
15	1	0,745	0,255	0,255
17	1	0,745	0,255	0,255
18	1	0,745	0,255	0,255
19	1	0,745	0,255	0,255
20	1	0,745	0,255	0,255

somma	4,235	4,335
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi di WNDV nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito valori dell'indice di concordanza ottimi. La riproducibilità dei risultati è soddisfacente, nonostante la scarsa ripetibilità dei risultati forniti dal Laboratorio 10.

BDV

Tabella 15. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi di **BDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	<i>Accordi osservati</i> [^]	<i>Accordi casuali</i> [^]
<i>accordi neg-</i>	867	$(867*867)/1020=736,95$
<i>accordi pos+</i>	153	$(153*153)/1020=22,95$
<i>totale accordi</i>	1020	$736,95+22,95=759,9$

[^] cfr. tabella 11

Tabella 15. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi di **BDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,335}{4,335} = 1$$

Codice Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,745	0,255	0,255
2	1	0,745	0,255	0,255
3	1	0,745	0,255	0,255
5	1	0,745	0,255	0,255
6	1	0,745	0,255	0,255
7	1	0,745	0,255	0,255
8	1	0,745	0,255	0,255
10	1	0,745	0,255	0,255
11	1	0,745	0,255	0,255
12	1	0,745	0,255	0,255
13	1	0,745	0,255	0,255
14	1	0,745	0,255	0,255
15	1	0,745	0,255	0,255
17	1	0,745	0,255	0,255
18	1	0,745	0,255	0,255
19	1	0,745	0,255	0,255
20	1	0,745	0,255	0,255

somma	4,335	4,335
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi di BDV nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito un valore dell'indice di concordanza massimo.

EHV-1

Tabella 16. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi di **EHV-1** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	810	$(816*816)/1020=652,8$
accordi pos+	198	$(153*153)/1020=40,8$
totale accordi	1020	$652,8+40,8=693,6$

[^] cfr. tabella 12

Tabella 16. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi di **EHV-1** (17 laboratori, 1.020determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,335}{4,335} = 0,96$$

Codice Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,745	0,255	0,255
2	1	0,745	0,255	0,255
3	1	0,745	0,255	0,255
5	1	0,745	0,255	0,255
6	1	0,745	0,255	0,255
7	1	0,745	0,255	0,255
8	1	0,745	0,255	0,255
10	0,933	0,680	0,253	0,320
11	1	0,745	0,255	0,255
12	0,867	0,680	0,187	0,320
13	1	0,745	0,255	0,255
14	1	0,745	0,255	0,255
15	1	0,745	0,255	0,255
17	1	0,745	0,255	0,255
18	1	0,745	0,255	0,255
19	1	0,745	0,255	0,255
20	1	0,745	0,255	0,255

somma	4,265	4,465
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi di EHV-1 nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito valori dell'indice di concordanza SODDISFACENTI, nonostante la scarsa ripetibilità dei risultati forniti dai Laboratori 10 e 12.

3.5.4. DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Tabella 17. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** (17 laboratori, 1.020determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	501	(510*510/1020=255)
accordi pos+	501	(510*510/1020=255)
totale accordi	1002	255+255=510

[^] cfr. tabella 13

Tabella 17. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi simultanea (in parallelo) di WNDV-BDV-EHV-1 (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,335}{4,335} = 0,96$$

Codice Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,5	0,5	0,5
2	1	0,5	0,5	0,5
3	1	0,5	0,5	0,5
5	1	0,5	0,5	0,5
6	1	0,5	0,5	0,5
7	1	0,5	0,5	0,5
8	1	0,5	0,5	0,5
10	0,833	0,500	0,333	0,500
11	1	0,5	0,5	0,5
12	0,867	0,500	0,367	0,500
13	1	0,5	0,5	0,5
14	1	0,5	0,5	0,5
15	1	0,5	0,5	0,5
17	1	0,5	0,5	0,5
18	1	0,5	0,5	0,5
19	1	0,5	0,5	0,5
20	1	0,5	0,5	0,5

somma	8,200	8,500
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito valori dell'indice di concordanza SODDISFACENTI, nonostante la scarsa ripetibilità dei risultati forniti dai Laboratori 10 e 12.

Valutazione generale Inter-laboratorio: Accuratezza e Riproducibilità

Codice laboratorio	WNDV		BDV		HVI		WNDV+BDV+EHV-1 simultanea	
	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza
Reproducibilità 15 Labs accurati e precisi (N=900)	1	100%	1	100%	1	100%	1	100%
Reproducibilità 17 Labs (N=1020)	0,977	99,4%	1	100%	0,963	98,8%	0,966	98,3%

La rete dei 17 laboratori partecipanti, includendo nell'analisi anche i 2 laboratori che hanno fornito risultati di accuratezza e ripetibilità non soddisfacenti, ha mostrato la capacità di fornire risultati con accuratezza > 98% e riproducibilità > 0,97.

Tale risultato viene considerato SODDISFACENTE ad indicare le elevate performance delle metodiche RT-PCR utilizzate per la diagnosi singola e simultanea (in parallelo) di WNDV-BDV-EHV-1.

In particolare si rilevano sensibilità, specificità e riproducibilità tali da prefigurare un efficace utilizzo di tali metodiche per la diagnosi differenziale e simultanea dei 3 virus nella routine diagnostica della rete dei Laboratori IZZSS.

4. Valutazioni Finali

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 nei confronti dei 3 virus. 2 laboratori hanno invece mostrato minore accuratezza (< 100%) per una o più diagnosi e valori di Kappa < 0,8 a causa di risultati discordanti forniti nelle 3 sedute indipendenti di prova sugli stessi campioni di riferimento.

Nel complesso alla valutazione della Riproducibilità i 17 laboratori inclusi nell'analisi 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 ai 3 virus.

I risultati ottenuti hanno evidenziato elevate sensibilità e specificità diagnostiche dei metodi Real-Time PCR messi a punto per la ricerca simultanea 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 fondamentale ai fini del loro impiego nell'ambito dell'attività di sorveglianza.

Le criticità rilevate nei Laboratori 10 e 12 sono costituite da scarsa accuratezza e ripetibilità. Si ritiene che tali risultati siano stati causati da errori grossolani compiuti nella esecuzione delle prove. Tale considerazione deriva dall'osservazione che in questi 2 laboratori gli "errori" (falsi positivi-falsi negativi) sono occorsi solo in una delle 3 sedute indipendenti.

Lista dei Laboratori partecipanti

DENOMINAZIONE LABORATORIO
<i>IZS-PB UO Virologia e Malattie esotiche</i>
<i>IZS-UM Centro Referenza Pesti suine</i>
<i>IZS-UM Virologia</i>
<i>IZS-NA Dipartimento Sanità Animale - UOS Virologia</i>
<i>IZS-Ve Laboratorio Virologia Speciale</i>
<i>IZS-Ve Sezione Verona ?</i>
<i>IZS-LER - Reparto Virologia e Sierologia Specializzata</i>
<i>UNI-TO Dipartimento Produzioni Animali - Settore Malattie Infettive</i>
<i>IZS-SS Laboratorio Virologia</i>
<i>IZS-SICILIA Area Biologia Molecolare</i>
<i>IZS-LT Ufficio Staff Biotecnologie</i>
<i>IZS-LT DO DMV</i>
<i>AFSSA Alfort 94703 Maisons-Alfort (France)</i>
<i>IZS-TO C.E.A.</i>
<i>IZS-LER - Reparto Biologia molecolare</i>
<i>Duncombe Laboratory (Caen – France)</i>
<i>Istituto Superiore di Sanità – Laboratorio di virologia</i>

Bibliografia

- OIE quality standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases – OIE (2003)
- Norma UNI CEI EN ISO IEC 17025 “ Requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e di taratura” Novembre 2000
- Norma ISO 3534-1: metodi statistici per il controllo di qualità -febbraio 2000
- Norma ISO 5725-1: Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 1: Principi generali e definizioni – agosto 2004
- Manual of Standard, Diagnostic Test and vaccines O.I.E. (2000 e 2004)
- Fleiss, J. L. (2003). Statistical methods for rates and proportions. 3rd ed. New York: John Wiley, 598-626
- Douglas G. Altman “Practical statistics for medical research”; prima ed., Chapman and Hall, London, 1991 – pag. 403-409

SVILUPPO DI METODI DIAGNOSTICI IMMUNOLOGICI

PREPARAZIONE DELL'ANTIGENE WEST NILE PER LA PRODUZIONE DI ANTICORPI MONOCLONALI

Per la produzione di anticorpi monoclonali gli antigeni WNV sono stati coltivati, concentrati e parzialmente purificati secondo la metodica riportata in seguito.

Il ceppo WNV Egypt 101 è stato inoculato su monostrato preformato della linea cellulare BHK21.

Il ceppo EHV 1 Kentucky D è stato inoculato su monostrato preformato della linea cellulare RK 13.

Ad effetto citopatico completo, le colture sono state sottoposte ad un ciclo di congelamento- scongelamento ed in seguito chiarificate mediante centrifugazione a 4000 rpm per 30'.

Ai sovrantanti sono stati aggiunti l'8% (peso/volume) di PEG 6000 e NaCl 0.5M, e posti in agitazione 4° C overnight. I virus sono stati quindi precipitati mediante centrifugazione a 5000 rpm per 30' ed i sedimenti risospesi in tampone PBS pH 7,4 ad 1/20-30 del volume iniziale. In seguito ad una ulteriore chiarificazione mediante centrifugazione i sovrantanti sono stati sottoposti ad ultracentrifugazione a 35.000 rpm per 2 ore (rotore TST41 kontron) su cuscino di saccarosio al 25% (peso/peso) ed i sedimenti risospesi in PBS concentrando 100X rispetto al volume iniziale.

Dopo averne determinato il contenuto proteico, topi Balb/c sono stati immunizzati mediante inoculazione sottocutanea con 100µg di antigene parzialmente purificato in adiuvante completo di Freund seguita dopo 30 giorni da una inoculazione intraperitoneale con 50µg di antigene non adiuvato. Tre giorni dopo, gli splenociti murini sono stati ibridizzati con cellule di mieloma murino NS0 in presenza di Peg 4000 secondo metodica standardizzata (Galfre, G., Milstein, C.,1981).

Lo screening degli ibridomi ottenuti è stato eseguito mediante ELISA indiretta, adottando gli stessi antigeni utilizzati come immunogeni e mediante immunofluorescenza su cellule infette e non infette per verificare le specificità dei legami.

Produzione e acquisizione di sieri positivi e negativi per i diversi virus e di stipiti virali di campo e di riferimento

WEST NILE - PRODUZIONE DI SIERI IMMUNI DI POLLO.

Sono stati utilizzati in totale cinque polli SPF. Tre di questi (controlli positivi) sono stati infettati sperimentalmente per via intramuscolare con 106.5 TCID₅₀ del ceppo WNV E101 coltivato su BHK21 mentre i restanti due polli (controlli negativi), sono stati inoculati per via intramuscolare con una sospensione cellulare di BHK21. I prelievi ematici sono stati eseguiti il giorno dell'infezione ed a 7, 15, 24, 42 giorni post-infezione.

WEST NILE - PRODUZIONE DI SIERI IMMUNI EQUINI

Due pony testati, sieronegativi sono stati vaccinati per via intramuscolare con 3 dosi del vaccino inattivato "West Nile – Innovator" prodotto dalla Fort Dodge. Dopo 35

giorni dal primo intervento vaccinale è stata eseguita una seconda vaccinazione con ulteriori 3 dosi.

I prelievi ematici sono stati eseguiti all'inizio della sperimentazione ed in seguito a 15,21,28 giorni dopo la prima vaccinazione e 31gg giorni dopo la seconda vaccinazione.

ANTICORPI MONOCLONALI

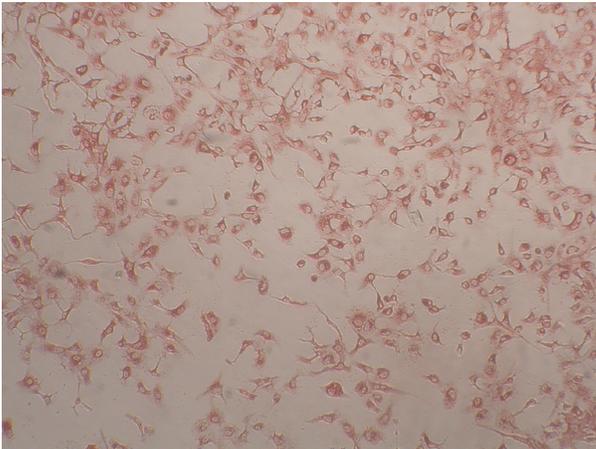
Attraverso 2 procedimenti di fusione eseguiti secondo metodica standardizzata (Galfre, G., Milstein, C.,1981), sono stati ottenuti un cospicuo numero di ibridomi produttori Mab reattivi verso l'antigene immunizzante.

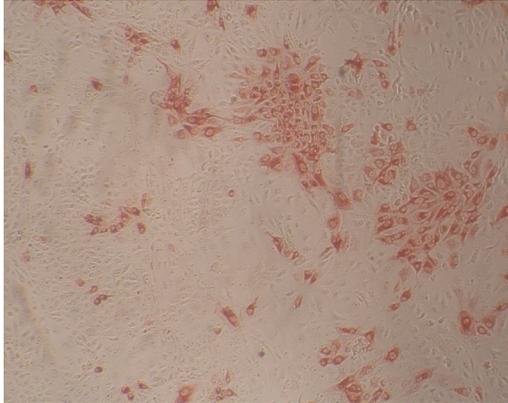
Lo screening degli ibridomi ottenuti è stato eseguito mediante ELISA indiretta, adottando lo stesso Ag utilizzato come immunogeno e mediante immunofluorescenza su cellule infette e non infette per verificare la specificità del legame.

La reattività dei Mabs è stata valutata allestendo una serie di reazioni di tipo ELISA competitiva, volte a valutare la competizione reciproca tra i Mabs e sieri immuni prodotti in polli SPF infettati sperimentalmente e sieri equini immunizzati con il vaccino inattivato "West Nile – Innovator" prodotto dalla Fort Dodge.

I Mabs per i quali il legame all'antigene era inibito esclusivamente dai sieri di pollo infettati con WNV e dai sieri equini immunizzati, erano scelti come candidati per l'allestimento della reazione ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-WNV.

Ulteriori informazioni riguardanti l'attività neutralizzante e la specificità sono state ottenute saggiando tutti i Mabs in sieroneutralizzazione con 100 TCDI50 del ceppo WNV E101 e mediante immunoperossidasi su monostrato cellulare Vero non infetto e infetto con WNV E101 e virus Usutu (USUV).





Immunoperoxidasi su monostrato cellulare Vero infetto con USUV.

I Mabs prodotti con i risultati ottenuti in sieroneutralizzazione, ELISA competitiva ed immunoperoxidasi sono riportati nella tabella

Mabs	SN	ELISA competitiva con sieri equini e di pollo	IP WNV	IP USUV	IP VERO
3B2 + altri 12 Mabs	+	+	+	-	-
1C3 + altri 15 Mabs	-	+	+	-	-
2A8 + altri 8 Mabs	-	+	+	+	-

Sulla base dei risultati ottenuti sono stati selezionati 4 Mabs (3B2, 4D3, 3D6, 1C3). Questi sono stati prodotti e purificati in concentrazioni utili per la marcatura con perossidasi e l'allestimento del test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi anti-WNV in sieri equini e aviari.

CLONAGGIO DEGLI IBRIDOMI, PRODUZIONE DI MABS CONCENTRATI E MARCATURA

I quattro ibridomi selezionati, produttori anticorpi reattivi verso l'antigene virale desiderato, sono stati clonati mediante diluizione limite.

I cloni sono stati cresciuti in coltura e le IgG murine purificate mediante cromatografia di affinità utilizzando la proteina A di Staphylococcus che si lega al frammento Fc delle catene pesanti (Harlow E., Lane D.1988).

I Mabs purificati sono stati coniugati con l'enzima perossidasi di rafano (Horse Radish Peroxidase, Hrp) (Tjissen P., Kurstak E. 1984).

Con le possibili combinazioni di Mabs, rispettivamente adsorbiti come anticorpi di cattura e coniugati sono state allestite reazioni ELISA di tipo sandwich e competitivo.

Il Mab 3B2 che ha fornito i migliori risultati è stato selezionato per l'allestimento del test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi anti WNV in sieri equini.

ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI WNV.

Preparazione dell'antigene

Il ceppo WNV Egypt 101 è stato cresciuto su monostrato preformato della linea cellulare BHK21.

Ad effetto citopatico completo, la tessuto coltura precedentemente sottoposta ad un ciclo di congelamento-scongelo, è stata aggiunta di Betapropionolattone 0,05% (v/v) e lasciata una notte a 4°C e 2 h a 37°C prima di essere chiarificata mediante centrifugazione 4000 rpm per 30'. Effettuato il controllo ai in attivazione il sovrantante è stato aggiunto l'8% (peso/volume) di PEG 6000 e NaCl 0.5M e posto in agitazione a 4° C overnight. La sospensione è stata quindi centrifugata a 5000 rpm per 30' e il sedimento risospeso in tampone PBS pH 7,4 ad 1/20-1/30 del volume di partenza. In seguito ad una ulteriore chiarificazione mediante centrifugazione (7000 rpm per 30'), il sovrantante è stato ultracentrifugato a 35.000 rpm per 2 ore (rotore TST41 kontron) su cuscino di saccarosio al 25% (peso/peso) e il sedimento risospeso in PBS concentrando 100X rispetto al volume iniziale.

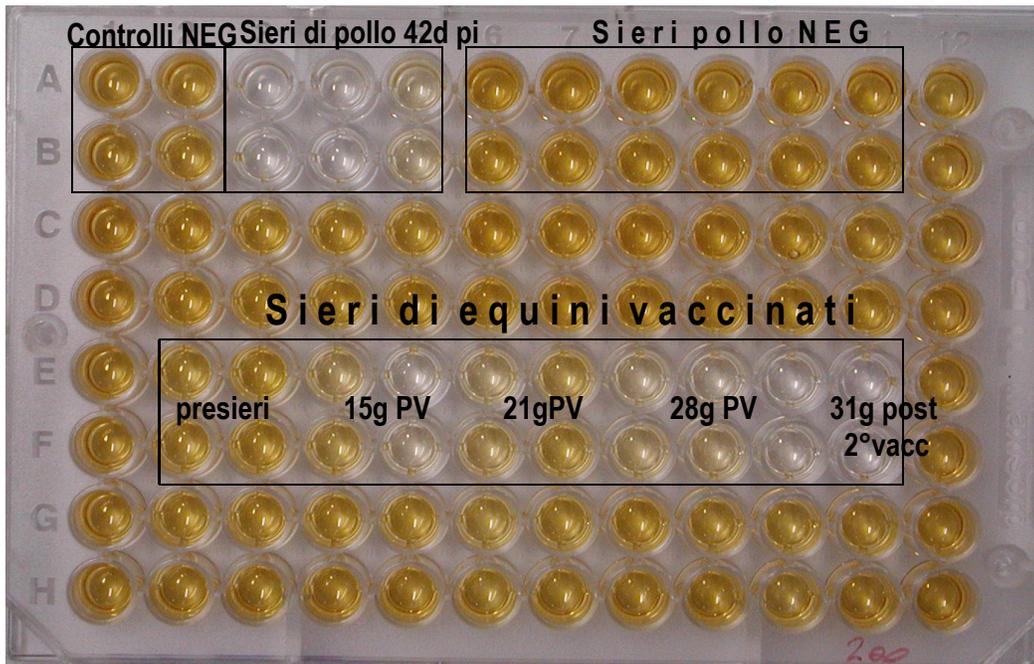
L'antigene così risospeso è stato addizionato di un equal volume di glicerina e stoccato a - 20°C.

Test ELISA

Piastre per ELISA Nunc maxisorp sono state adsorbite con antigene WNV alla diluizione d'uso in tampone carbonato-bicarbonato pH 9,6 per una notte a 4°C. Dopo la fase di lavaggio, 50 µl di ogni siero sono stati aggiunti nella piastra di reazione ed esaminati in due diluizioni: 1/5-1/10 per i sieri equini e 1/10-1/20 per i sieri di pollo. Immediatamente dopo sono stati aggiunti in ciascun pozzetto 25µl di Mab 3B2 coniugato con perossidasi opportunamente diluito. Dopo un'ora di incubazione a 37° C e la successiva fase di lavaggio è stato aggiunto il substrato cromogeno OPD (Orto-Phenil-Diaminobenzidina) ed eseguita la lettura tramite spettrofotometro con filtro a 492 nm.

Nella figura 1 è riportato un esempio della reazione ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-WNV eseguita con i sieri sperimentali di cavallo e di pollo.

Figura 1: ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-WNV.



PROCEDURA OPERATIVA STANDARD PER L'ESECUZIONE DELL'ELISA PER LA RICERCA DI ANTICORPI VERSO IL VIRUS DELLA WEST NILE DISEASE

1. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo viene impiegato per la ricerca di anticorpi diretti contro WNDV. Nella metodica viene impiegato un antigene inattivato e due anticorpi monoclonali (Mab), diretti contro epitopi del virus.

Lo schema della reazione prevede una prima fase di “contatto” dell’antigene con uno dei due Mab (catcher), precedentemente adsorbito alla piastra ELISA.

Successivamente a questa prima incubazione, viene aggiunto il campione in esame e dopo, senza il lavaggio del pozzetto, viene aggiunto il secondo Mab (tracer), coniugato con l’enzima perossidasi (HRP): l’eventuale presenza, nel siero in esame, di anticorpi diretti contro il WNDV ostacola l’interazione tra gli epitopi virali e uno o tutti e due i Mab. In entrambi i casi, si avrà l’inibizione dello sviluppo della colorazione, che dovrebbe seguire all’aggiunta del substrato cromogeno dell’HRP. La positività di un campione determina quindi l’inibizione dello sviluppo della colorazione.

La tecnica prevede le seguenti fasi:

- 1) ciclo di lavaggi della micropiastra preadsorbita con il Mab
- 2) distribuzione dell’antigene inattivato del WNDV ed incubazione
- 3) allestimento delle diluizioni di esame dei campioni sulla piastra di diluizione
- 4) ciclo di lavaggi della piastra adsorbita con Mab/antigene
- 5) aggiunta dei sieri in esame sulla piastra adsorbita di Mab/antigene ed incubazione
- 6) aggiunta ed incubazione del Mab “tracer” ed incubazione
- 7) ciclo di lavaggi
- 8) distribuzione del substrato cromogeno e successivo arresto della reazione
- 9) lettura della densità ottica

NB: La prediluizione dei sieri in esame è eseguita su una piastra a 96 pozzetti con fondo a “U”, detta piastra di diluizione, che deve essere in plastica “inerte” e non permette l’adsorbimento dei sieri; la competizione tra i sieri in esame ed i due Mab viene invece eseguita in una seconda piastra a 96 pozzetti (“Nunc Maxisorp”), detta piastra di rilevamento.

2. APPARECCHIATURE

Micropipettatrice multicanale in grado di erogare volumi variabili da 10-50 µl

Micropipettatrice multicanale in grado di erogare volumi variabili da 50-250 µl

Micropipettatrice singola in grado di erogare volumi variabili da 10-20 µl

Micropipettatrice singola in grado di erogare volumi variabili da 20-200 µl

Pipettatrice

Incubatore termostatico (+ 37°C ± 3°C)

Agitatore rotante per micropiastre (opzionale)

Agitatore per micropiastre

Frigorifero (+ 4°C ± 2°C)

Congelatore (-20°C ± 5°C)

Fotometro per la lettura in assorbanza delle micropiastre (λ utilizzata 490-492 nm),

Sistema di lavaggio per piastre (opzionale, consigliabile in caso si eseguano esami impiegando contemporaneamente numerose piastre)

pHmetro

3. MATERIALI DI LABORATORIO

Micropiastre a 96 pozzetti con fondo piatto (Nunc Maxisorp o altro articolo verificato come idoneo)

Micropiastre a 96 pozzetti in plastica “inerte”

Coperchi per micropiastre

Puntali

Vaschette porta reagenti

Pipette, provette e vetreria di volume adeguato per la preparazione dei reagenti

4. REAGENTI

4.1. Piastra preadsorbita con il Mab catcher

Conservazione: in frigorifero a temperatura +4°C ± 2°C

4.2. Antigene WNDV inattivato

Criolistato di antigene WNDV inattivato

Conservazione: in congelatore a temperatura -20°C ± 5°C

Titolo d'uso: 1:10

NB: preparare la soluzione, di volta in volta, solo immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente (vedi punto 4.8)

4.3. Anticorpo monoclonale con persossidasi “tracer”

In soluzione di 50% glicerina/50% PBS

Conservazione: in congelatore a temperatura di -20°C ± 5°C

Titolo d'uso: 1:300

NB: Preparare la diluizione d'uso, di volta in volta, solo immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente (vedi punto 4.8)

4.4. Siero di controllo negativo

Siero di cavallo negativo per la presenza di anticorpi nei confronti del WNDV

In soluzione di 50% glicerina/50% siero

Conservazione: in congelatore a temperatura -20°C ± 5°C

Titolo d'uso: tal quale

4.5. Siero di controllo positivo

Siero equino vaccinato nei confronti del WNDV positivo per la presenza di anticorpi nei confronti del WNDV

In soluzione di 50% glicerina/50% siero

Conservazione: in congelatore a temperatura -20°C ± 5°C

Titolo d'uso: tal quale

4.6. Tampone PBS

Composizione per litro:

cloruro di sodio 8 g

potassio cloruro 0,2 g

sodio fosfato bibasico x 12H₂O 2,9 g

potassio fosfato monobasico 0,2 g

acqua demineralizzata quanto basta a 1000 ml

Preparazione: sciogliere i sali nell'acqua mediante agitazione, controllare il pH (7,4 ± 0,2)

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: tre mesi

4.7. Tampone Lavaggio

Composizione:

PBS pH 7,4 ± 0,2, contenente Tween 20

(Polyoxyethylene-sorbitan monolaureate) allo 0,05% v/v

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: sette giorni

4.8. Tampone Diluente (TD)

Composizione:

Tampone Lavaggio contenente estratto di lievito al'1% v/v

Conservazione: +4 °C ± 2 °C

Validità: tre mesi

Categoria di rischio: l'acido citrico (R41-37/38; S26-36) e irritante per le vie respiratorie e la pelle

4.10. Soluzione Substrato Cromogeno

Composizione per litro:

OPD (ortophenylendiamine in pasticche pre-pesate) 0,5 mg/ml

H₂O₂ (perossido di idrogeno) allo 0,02%,

abituamente vengono usate soluzioni al 30% o al

35%; manipolare con guanti protettivi

Preparazione:

Sciogliere le pasticche di OPD nel volume appropriato di tampone fosfato-citrato (vedi punto 12), portato a temperatura ambiente. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere H₂O₂ in concentrazione dello 0,02% finale (esempio: H₂O₂ al 30% deve essere diluito 1/1500; H₂O₂ al 35% deve essere diluito 1/1750; per un volume di 21 ml di soluzione di OPD, aggiungere 14 µl di H₂O₂ al 30% o 12 µl di H₂O₂ al 35%)

Conservazione:

La soluzione di OPD eventualmente preparata in eccesso, prima dell'aggiunta di H₂O₂, , puo essere aliquotata e conservata in congelatore a -20°C — 5°C.

Tali aliquote andranno scongelata al buio subito prima dell'uso. Eliminare la soluzione se al momento dell'impiego si nota un viraggio anche lieve della soluzione da incolore a giallo. Dopo l'aggiunta dell' H₂O₂, la soluzione non e stabile ed e anche fotosensibile, pertanto, deve essere utilizzata immediatamente. Validità: tre mesi

Categoria di Rischio: l'OPD in polvere e potenzialmente cancerogeno (R45, 20-22, 36-38, 42,43; S 45, 26, 36-37, 39).

Tuttavia, la concentrazione di OPD nella soluzione d'uso è inferiore ai limiti di legge previsti per l'apposizione di specifiche frasi di rischio. Manipolare polvere e soluzioni indossando guanti protettivi. Eliminare la soluzione in eccedenza secondo le procedure previste.

4.11. Soluzione di arresto: Acido solforico (H₂SO₄) 1M

Composizione: Acido solforico (96%) 56 ml

Acqua distillata quanto basta a 1000 ml

Preparazione: Aggiungere lentamente e con cautela l'acido all'acqua, quindi portare a volume. Evitare assolutamente di effettuare l'operazione inversa.

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: 12 mesi

5. PROCEDURA DELLA PROVA

tutti i reagenti devono essere usati a temperatura ambiente e qualora fossero in soluzione devono essere agitate energicamente prima dell'uso

5.1 LAVAGGIO DELLA PIASTRA PRESENSIBILIZZATA

Distribuire in ogni pozzetto 200 – 300 µl di tampone di lavaggio ed attendere almeno 2 minuti. Ripetere tale operazione 3 volte. Trascorso tale periodo, vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

5.2 AGGIUNTA DELL' ANTIGENE INATTIVATO DEL WNDV

Aggiungere ad ogni pozzetto della piastra presensibilizzata, 50µl di Ag diluito in TD ed incubare la piastra per 37°C per 90 minuti.

5.3 LAVAGGIO DELLA PIASTRA SENSIBILIZZATA Mab/Ag

Distribuire in ogni pozzetto 200 – 300 µl di tampone di lavaggio ed attendere. Ripetere tale operazione 3 volte. Trascorso tale periodo, vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

5.4 ALLESTIMENTO DELLA PIASTRA DI DILUIZIONE

Si riporta lo schema di distribuzione di sieri e controlli nella "Piastra di diluizione" (figura 1). Lo schema si riferisce ad una piastra completa e, per ragioni di praticità, la procedura sotto riportata fa riferimento ad essa; qualora si usassero schemi di distribuzione diversi, assicurarsi che siano rispettate le diluizioni ed il numero delle repliche previste per i controlli ed i sieri in esame.

Nota: Questo schema di distribuzione consente un riconoscimento immediato della corretta posizione dei campioni nel momento in cui vengono trasferiti dalla piastra di diluizione a quella di rilevamento per averli, dopo questa operazione, in doppia replica.

Figura 1 - Piastra di diluizione /Piastra di rilevamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
D	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	K+	CR
F	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	K+	CR
G	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	K-	CR
H	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	K-	CR

n°Siero	1.5
	1:10

Durante l'incubazione dell'antigene, distribuire in una piastra di plastica inerte a 96 pozzetti, fondo U, i sieri da esaminare diluiti come segue:

- per la diluizione 1/5, distribuire 160 µl di TD + 40 µl di siero
- per la diluizione 1/10, distribuire 50 µl di 1/5 in 50 µl di TD
- i sieri di controllo positivo e negativo sono trattati come i sieri in esame
- per il controllo antigene, aggiungere 100 µl di TD in ciascun pozzetto dedicato

5.5 TRASFERIMENTO DEI CONTROLLI, DEI SIERI IN ESAME E DELL'ANTIGENE NELLA PIASTRA DI RILEVAMENTO

- Terminata l'incubazione al punto 5.2, trasferire come riportato in figura 1, 50 µl dei sieri diluiti, compresi i controlli, dalla piastra di diluizione a quella di rilevamento.
- Incubare a 37°C per 60 minuti.

5.6 AGGIUNTA Mab tracer

Senza lavare, aggiungere 25 µl di Mab tracer diluito in TD in ogni pozzetto in esame ed incubare la piastra per 37°C per 90 minuti.

5.7 LAVAGGIO

- Distribuire in ogni pozzetto 200-300 µl di tampone di lavaggio
- Attendere almeno 2 minuti e vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.
- Ripetere le operazioni descritte complessivamente 3 volte.

5.5 REAZIONE CROMOGENA

- Alcuni minuti prima del termine dell'incubazione della piastra di rilevamento, scongelare al buio il substrato cromogeno eventualmente preparato e stoccato.
- Aggiungere l'H₂O₂ al substrato cromogeno alla concentrazione finale dello 0,02%

- Distribuire 50 µl del substrato in ogni pozzetto
- Incubare per 5-7 minuti a temperatura ambiente controllando l'intensità di sviluppo della reazione.

5.6 BLOCCO DELLA REAZIONE

- Al termine delle operazioni di cui al punto 5.5, aggiungere in tutti i pozzetti 50 µl della soluzione di arresto.

5.7 LETTURA

- Rilevare immediatamente le assorbanze (DO) dei pozzetti, ad una lunghezza d'onda di 492nm, eseguendo il bianco contro aria.
- Riportare i valori di densità ottica nell'apposito modulo della registrazione dei risultati

**Circuito interlaboratorio per la Validazione
Preliminare dell'ELISA Competitiva in Fase Solida per
la Ricerca di Anticorpi Verso il Virus della West Nile**

Per la validazione del test sono state seguite le linee guida del Manuale OIE [1].

1. 1. Definizione dello scopo del test

1. Idoneità allo scopo

Lo scopo del test è di monitorare lo stato sierologici degli equidi, come per le sentinelle previste dal piano nazionale WND. Il test è di screening, e le eventuali positività devono essere riconfermate con il metodo di riferimento per valutare la specificità e analizzare ulteriormente per la ricerca di IgM.

1.2. Idoneità all'utilizzo

I requisiti considerati sono i seguenti:

Disponibilità delle attrezzature: attualmente la tecnica ELISA è largamente adottata presso tutti i laboratori e gli stessi sono dotati dei materiali di consumo e delle apparecchiature necessarie all'esecuzione.

Livello di preparazione tecnica e facilità di interpretazione: la procedura di esecuzione richiede il medesimo livello di preparazione necessario all'utilizzo di qualsiasi altro kit ELISA. L'interpretazione della prova si basa su 3 criteri di validazione e sul confronto tra campioni in esame e controllo di reazione. Ogni campione è qualificato inequivocabilmente ed in modo oggettivo.

Disponibilità dei reagenti: il kit è già completo di quasi tutti i reagenti necessari per l'esecuzione della prova. L'utilizzatore si deve fornire solamente di reagenti di facile reperibilità.

Requisiti di trasporto: il kit necessita di essere spedito e mantenuto ad una temperatura che varia, a seconda dei reagenti, tra +4°C e - 20°C, requisito attualmente assicurato dalle principali ditte di spedizioni. L'antigene è inattivato con Betapropiolattone 0,05% (v/v) incubando per 2h a 37° e overnight a 4°C. Il controllo di inattivazione viene fatto tramite tre passaggi su cellule VERO.

Sicurezza e biosicurezza: in condizioni di norme generali di sicurezza tutte le fasi di esecuzione non comportano rischi per l'operatore.

Tempo di risposta: il tempo necessario per ottenere l'esito di un campione è di circa 4 ore e 30 minuti. Inoltre questo formato permette di attivare la prova in qualsiasi giorno in quanto non necessita di programmare l'adsorbimento.

2. Sviluppo del test

2.1 Studi sperimentali

L'ELISA è stata messa a punto testando sieri equini di animali vaccinati ed infettati sperimentalmente oltre a sieri di campo campionati nel corso dell'epidemia 2008/2009 e confrontando i risultati con la sieroneutralizzazione. Per le piastre sensibilizzate sono stati fatte analisi comparative con piastre non stabilizzate.

3 Validazione interlaboratorio

3.1 Prova Ai laboratori è stato chiesto di eseguire tre prove indipendenti (tre diversi operatori o stesso operatore in tempi diversi). È stata inviata congiuntamente ai reagenti la procedura di esecuzione.

3.2 Reagenti

Per la prova sono stati forniti ai laboratori i seguenti reagenti:

- 3 piastre presensibilizzate con Mab;
- Antigene inattivato WNDV;
- Anticorpo Mab coniugato con perossidasi.

3.3 Pannello di sieri

A ciascun laboratorio sono stati distribuiti 40 campioni codificati con numero progressivo da 1 a 40. I 40 campioni derivano da un pannello di 20 sieri, ciascuno inviato in doppia aliquota. La reattività attesa dei sieri è stata classificata come SP (Strong Positive), MP (Medium Positive), WP (Weak Positive) o Negativo in relazione al valore di percentuale di inibizione (PI) come riportato nella tabella 1.

Tabella 1: Criteri di classificazione dei sieri in funzione della PI (percentuale di inibizione)

1:5		1:10	
>85%	e	>70%	SP
70%<PI<85%	e	50%<PI<85%	MP
50%<PI<70%	e	<70%	WP
<50%	e	<50%	NEG

Il pannello di sieri era composto da:

- sieri derivanti da diluizioni (1/3, 1/6, 1/10) di un siero di un equino vaccinato (Soggetto A);
- sieri derivanti da diluizioni (1/13, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200) di un siero di un altro equino vaccinato (Soggetto B);
- sieri derivanti da diluizioni (tal quale, 1/3, 1/6) di un siero di un soggetto naturalmente infetto (Soggetto C);
- sieri derivanti da diluizioni (tal quale, 1/2, 1/3) di un siero di un altro soggetto naturalmente infetto (Soggetto D);
- siero fetale equino (GIBCO®)

Nella tabella 2 è riportato il dettaglio dei sieri utilizzati.

Tabella 2: Composizione, origine e caratteristiche reattive del pannello di sieri.

	Diluizione	Numero siero pannello 20 sieri	Classificazione	Identificativo siero pannello 40 sieri
Soggetto A	1:3	3	SP	26,33
	1:6	7	MP	8,15
	1:10	11	WP	5,27
	1:13	4	SP	17,21
Soggetto B	1:50	8	SP	6,39
	1:100	12	MP	18,30
	1:150	13	MP	10,38
	1:200	14	WP	12,36
Soggetto C	Tal quale	1	SP	4,40
	1:3	2	SP	9,11
	1:6	9	SP	1,3
Soggetto D	Tal quale	5	MP	16,35
	1:2	6	MP	14,32
	1:3	10	SP	20,23
Siero fetale equino	Tal quale	15	NEG	2,19
	Tal quale	16	NEG	22,29
	Tal quale	17	NEG	31,37
	Tal quale	18	NEG	25,34
	Tal quale	19	NEG	7,13
	Tal quale	20	NEG	24,28

Altri reagenti necessari alla prova sono utilizzati nella routine dai laboratori per l'esecuzione della prova ELISA.

3.4 Risultati

Ai laboratori è stato richiesto di eseguire la prova secondo la procedura fornita e di inviare i risultati compilando un file excel con le sole densità ottiche (DO) dei sieri. Il CERME ha provveduto poi a verificare la validità delle piastre ed a classificare la reattività dei sieri. In Appendice II sono riportati i risultati di tutti i laboratori in termini di DO e PI; in Appendice III sono mostrati i valori dei controlli per ogni laboratorio e per ogni piastra.

3.5 Criteri di validazione delle prove

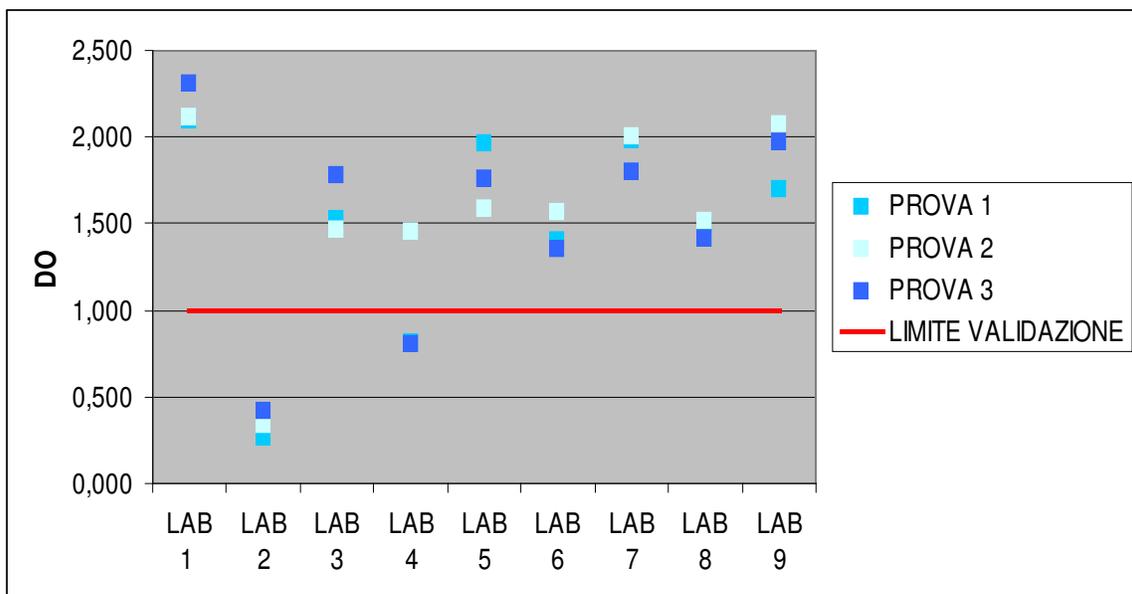
Sono state considerate valide le prove che hanno rispettato i seguenti criteri di validazione:

DO medio del controllo di reazione: maggiore di 1,0;

DO del controllo negativo: inferiore al 50% del PI della media dell' DO dell' antigene in entrambe le diluizioni;

DO del controllo positivo: uguale o maggiore al 50% del PI della media dell'DO dell'antigene in entrambe le diluizioni.

Delle 27 prove eseguite, 5 sono risultate non valide; di queste, 3 appartenevano al laboratorio 2 e le rimanenti al 4. In figura 1 sono mostrate le medie dei valori di DO delle quattro repliche del controllo di reazione per ogni singolo laboratorio. I dati riferiti all'unica piastra valida del laboratorio 4 sono stati utilizzati solo per l'analisi del CV intralaboratorio. Per gli altri indici di valutazione, queste prove sono state escluse in quanto non fornivano dati con lo stesso peso degli altri laboratori. In alcuni grafici verrà mostrato il confronto tra medie dei laboratori esclusi il 2 ed il 4 e le medie di tutti i laboratori, solo per valutare l'effetto della loro inclusione/esclusione.



3.6 Classificazione dei sieri

Ogni risultato è stato classificato in funzione della PI secondo la tabella 1. La classificazione è stata necessaria per la valutazione dell'accuratezza, della ripetibilità e della riproducibilità qualitativa

3.7 Accuratezza qualitativa

Secondo Langton et al. [2] l'accuratezza qualitativa si stima attraverso la specificità (Sp) e la sensibilità (Se). L'accuratezza è stata anche valutata mediante il K di Cohen, il K di Cohen pesato per ogni singolo laboratorio e il K multiplo di Cohen di tutti i laboratori, confrontando gli esiti ottenuti con quelli attesi.

3.7.1 Specificità e sensibilità

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati dell'ELISA a confronto con il risultato atteso, utilizzando solo 2 categorie (positivo e negativo).

Tabella 3: Confronto tra tecnica atteso e risultati in ELISA

ATTESO				
TOTALE		+	-	Totale
LAB	+	592	0	592
	-	0	248	248
	Totale	592	248	840

Per il calcolo della Se e della Sp sono stati utilizzati i rapporti esemplificati nella tabella 4 e nelle formule 1 e 2:

Tabella 4: Tabella di contingenza (2x2) per il confronto tra risultati attesi e ottenuti

	Positivi attesi	Negativi attesi
Positivi al test	a	b
Negativi al test	c	d

(1) $Se = a/(a+c)$

(2) $Sp = d/(b+d)$

In tabella 5 sono riportati i valori di Sp e Se che risultano entrambi pari al valore massimo possibile per ogni parametro.

Tabella 5: Valori di Se e Sp

Se (%)	100
Sp (%)	100

3.7.2 K di Cohen (a 2 e 4 categorie) per ogni laboratorio

Al fine di valutare la concordanza dei risultati ricevuti con quelli attesi espressi in due categorie, negativo e positivo, è stato inizialmente utilizzato il K di Cohen. Poiché i sieri inviati ai laboratori erano stati classificati secondo quattro categorie, per valutare più nel dettaglio l'andamento della concordanza si è proceduto alla stima K con 4 categorie.

Il K di Cohen rispetto ad una proporzione di concordanza semplice (numero di concordi sul totale) ha il vantaggio di depurare il K dall'effetto del caso. Infatti il K è definito come riportato nella formula 3 [3]:

Dove P_o è la proporzione di concordi sul totale e P_e la proporzione attesa per effetto del caso. Nella tabella 6 è esemplificato il confronto tra due osservatori. P_o in questo caso è la somma di a/N e b/N (i risultati concordi tra i due osservatori) e P_e è dato dalla somma dei prodotti dei totali marginali delle caselle dei concordi. Nell'esempio della tabella sottostante $P_e = (a+b/N)*(a+c/N) + (c+d/N)*(b+d/N)$; il primo prodotto è il P_e per i concordi positivi e il secondo il P_e per i concordi negativi. Lo stesso metodo si applica ad M categorie.

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Tabella 6: Esempio di tabella di contingenza per il confronto tra due osservatori

	Positivi osservatore A	Negativi osservatore A	
Positivi osservatore B	a/N	b/N	a+b/N
Negativi osservatore B	c/N	d/N	c+d/N
	a+c/N	b+d/N	1

Se prendiamo in considerazione il K di Cohen non pesato con due categorie, il valore è uguale ad 1 per tutti i laboratori eccetto che per il laboratorio 4 (che ha riportato come negativo, e non come positivo, il siero 14 nella prova 3), per il quale è risultato essere 0,98. Il K non pesato con quattro categorie ha fornito dei valori molto inferiori rispetto al K con due categorie, compresi tra 0,48 e 0,69. È prevedibile che il valore di K non pesato con quattro categorie sia più basso in considerazione del fatto che vengono valutati come non concordi tutti i risultati che si avvicinano anche molto al risultato atteso (MP invece di SP; MP invece di WP e viceversa). Per ovviare a questa distorsione si è proceduto alla stima del K di Cohen pesato.

3.7.3 K di Cohen pesato (4 categorie) per ogni laboratorio

Il K pesato tiene in considerazione anche di quanto il risultato sia lontano dall'atteso, attribuendogli un peso proporzionalmente decrescente, ed ovviando così al problema del K non pesato di considerare totalmente discordi i risultati che in realtà sono molto vicini all'atteso. In tabella 7 sono mostrati i pesi con cui è stato calcolato il K.

Nel nostro studio il K pesato è risultato essere compreso tra 0,7 e 0,81. Il valore di K pesato ottenuto con i nostri dati, secondo tabella interpretativa proposta da Landis et al [4] e riportata in tabella 8 risulta essere indice di un accordo da sostanziale a quasi perfetto.

Riteniamo importante sottolineare come la classificazione del valore del K non pesato, confrontata con quella del K pesato, passi da modesta/sostanziale a sostanziale/quasi perfetto.

Tabella 7: Valori dei pesi assoluti utilizzati in questo studio per il calcolo del K di Cohen pesato

Pesi assoluti della statistica K				
	N	WP	MP	SP
N	1	0,67	0,33	0
WP	0,67	1	0,67	0,33
MP	0,33	0,67	1	0,67
SP	0	0,33	0,67	1

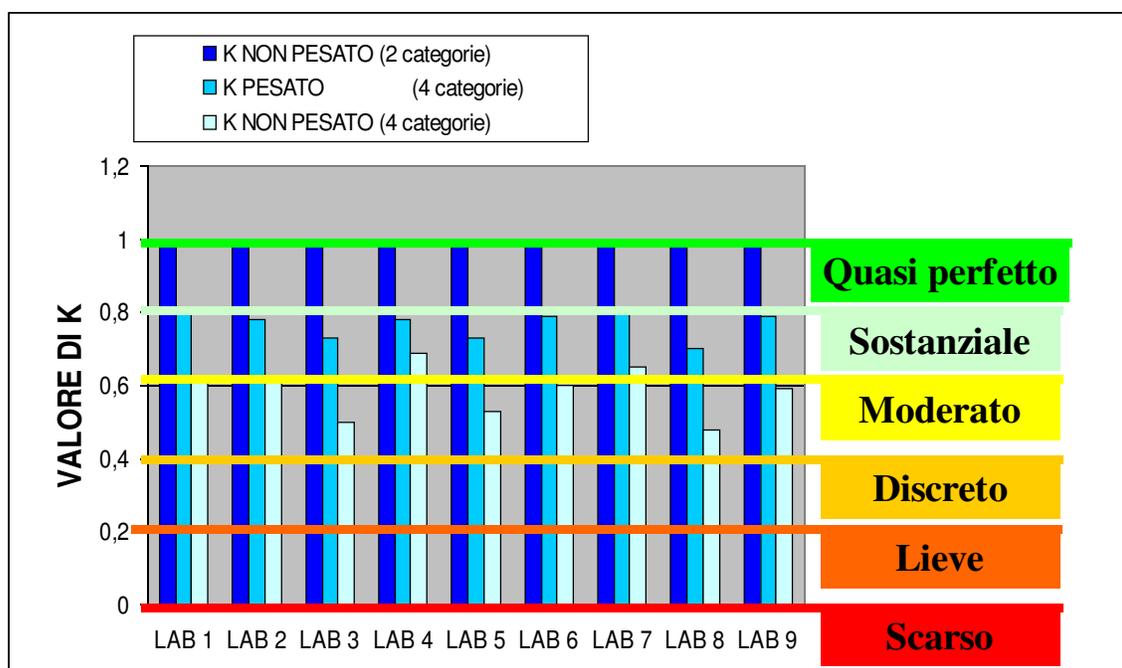
Tabella 8: Criteri di interpretazione di K proposti da J. Richard Landis e Gary G. Koch

Kappa	Grado di accordo
<0,00	Scarso
0,00-0,20	Lieve
0,21-0,40	Discreto
0,41-0,60	Moderato
0,61-0,80	Sostanziale
0,81-1,00	Quasi perfetto

In tabella 9 e in figura 2, sono mostrati i tre valori di k calcolati per ogni laboratorio.
Tabella 9: valori di K non pesato (2 categorie); K pesato e non pesato (4 categorie)

	K NON PESATO (2 categorie)	K NON PESATO (4 categorie)	K PESATO (4 categorie)
LAB 1	1	0,62	0,81
LAB 2	1	0,62	0,78
LAB 3	1	0,5	0,73
LAB 4	0,98	0,69	0,78
LAB 5	1	0,53	0,73
LAB 6	1	0,6	0,79
LAB 7	1	0,65	0,8
LAB 8	1	0,48	0,7
LAB 9	1	0,59	0,79

Figura 2: valori di K tra tutti i laboratori: non pesato a 2 categorie , non pesato a 4 categorie e pesato a 4 categorie. A destra i gradi di accordo secondo la tabella 8



3.7.4 K multiplo

Il valore del K multiplo è stato calcolato utilizzando come valori di Po e Pe quelli trovati per il K pesato a 4 categorie (Appendice VI). Questo valore di K indica quanto, tutti gli esiti di tutti i laboratori siano concordi rispetto all'atteso. Il valore ottenuto è di 0,76 classificato come sostanziale.

3.8 Ripetibilità e riproducibilità

Considerando la natura della prova ELISA, che fornisce un risultato sia in termini di DO, quindi quantitativo; che di categoria e quindi qualitativo; la valutazione della ripetibilità e della riproducibilità è stata condotta prendendo in considerazione: il coefficiente di variazione (CV), l'accordanza, la concordanza e il Concordance Odds Ratio (COR) secondo Langton, e il K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto [5;6] nelle Appendici V e VI sono mostrati tutti i dati relativi a questi parametri di valutazione.

3.8.1 Coefficiente di variazione

In Appendice IV sono mostrati tutti i dati relativi al CV. È stato valutato il CV tra:

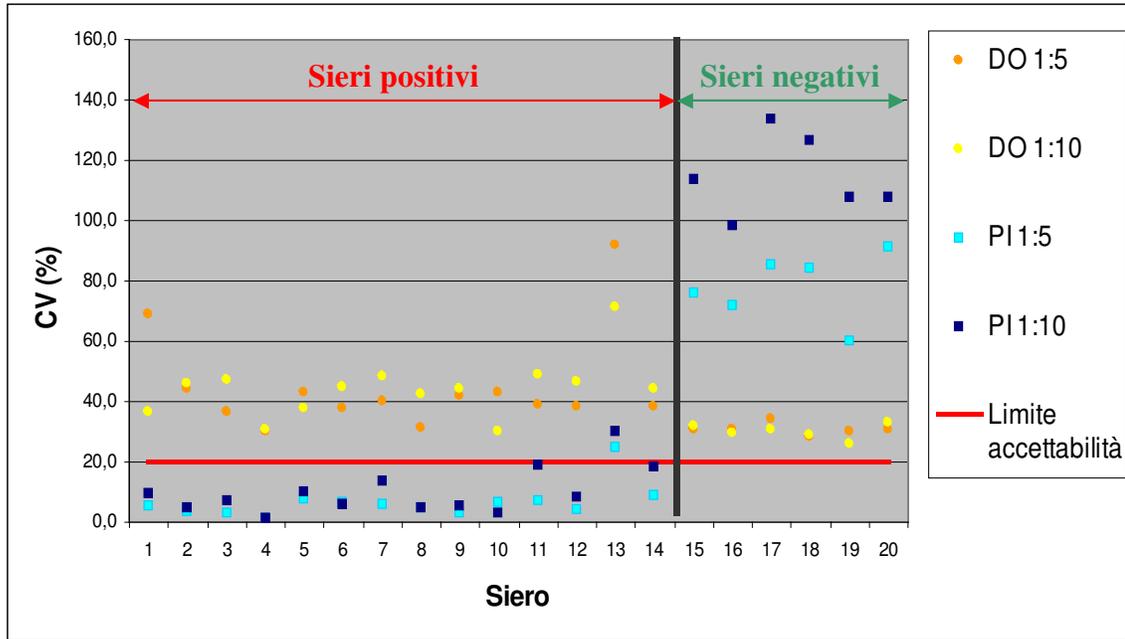
- i) le due repliche di ognuno dei 20 sieri, all'interno di ogni laboratorio per ogni prova effettuata;
- j) tutte le repliche (sei) di ognuno dei 20 sieri all'interno di ogni laboratorio;
- k) tutte le repliche di ciascuno dei 20 sieri considerando globalmente tutti i laboratori.

Il CV è stato calcolato sia per la diluizione 1/5 che per la diluizione 1/10; e sia per la DO che per la PI. È stato ritenuto accettabile un CV pari o inferiore al 20% [7].

Per motivi di chiarezza riportiamo in Figura 3 solo il CV per tutte le repliche e per tutti i laboratori. Nell'analisi dei CV, va considerata la natura competitiva della ELISA in questione: i sieri positivi avranno una DO bassa e una PI alta e viceversa per i negativi. Come possiamo vedere dalla figura, tutti i CV delle DO sono superiori al limite soglia. Per questo motivo si è deciso di adottare come parametro di valutazione il CV delle PI. Infatti, come possiamo vedere dalla figura, le PI dei sieri positivi hanno dei CV molto bassi, inferiori al 10%. Il calcolo della PI infatti neutralizza l'effetto di variabilità intralaboratorio mettendo in relazione le DO delle singole diluizioni del campione con quello del controllo di reazione della piastra. Per i sieri negativi la situazione è diversa: anche prendendo in considerazione la PI il CV è molto alto, più alto del rispettivo CV delle DO. Questo è spiegabile considerando che la PI dei sieri negativi tende allo zero e quindi una minima variazione influenza notevolmente il CV. Da notare anche che alcuni risultati in termini di PI sono di segno negativo, contribuendo quindi ad aumentare l'ampiezza del CV.

Considerando tutto quanto suddetto e che i sieri negativi sono stati classificati correttamente (come mostrato precedentemente nel capitolo sull'accuratezza), per la nostra valutazione si è tenuto conto solo dei CV dei sieri positivi.

Figura 3: Distribuzione dei CV dei sieri per ogni laboratorio considerando globalmente le tre prove



3.8.2 Accordanza

Secondo Langton [4] l'accordanza è l'equivalente qualitativo della ripetibilità ed è definita come la probabilità che un campione, analizzato in doppio, sotto condizioni di ripetibilità, dia lo stesso risultato qualitativo; indipendentemente dal risultato atteso.

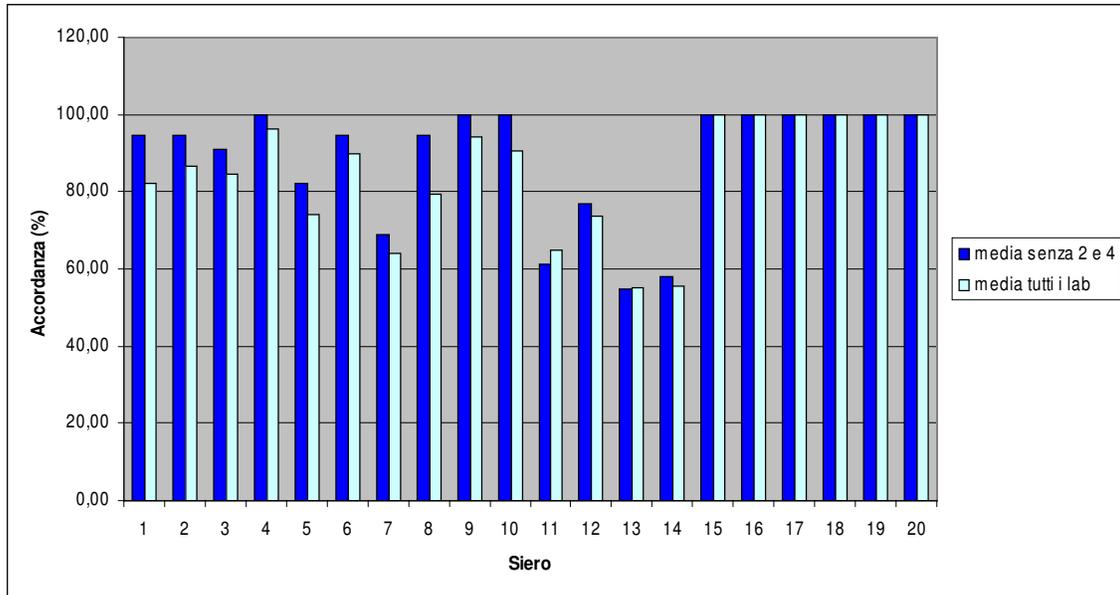
Riassumendo brevemente il metodo utilizzato possiamo dire che l'accordanza è il rapporto percentuale tra: il numero di risultati - per ciascun siero in esame - che, appaiati con gli altri risultati ottenuti dallo stesso laboratorio per quel siero, danno lo stesso risultato; e il numero totale di coppie possibili. Dato un numero n di risultati disponibili per ogni siero possiamo calcolare il numero di possibili accoppiamenti utilizzando la formula 4:

$$(4) C = \frac{n(n-1)(n-2) \dots (n-k+1)}{n!}$$

C= numero di combinazioni possibili
 n= numero di risultati
 k= numero di risultati per ogni combinazione

In figura 4 sono mostrati i valori medi di accordanza per ogni siero per tutti i laboratori e quelli medi escludendo i due laboratori con prove non validabili (laboratorio 2 e 4). Come si può desumere osservando la figura, per la maggior parte dei sieri, l'accordanza calcolata sui 7 laboratori è più alta rispetto a quella calcolata su tutti i laboratori; in tre casi (siero 4,9,10) l'accordanza epurata dalle prove non valide arriva al 100%. Per i sieri negativi invece è risultata pari al 100% in entrambi i casi.

Figura 4: Valori medi di accordanza per ogni siero tra tutti i laboratori confrontati con quelli medi escludendo i laboratori 2 e 4.



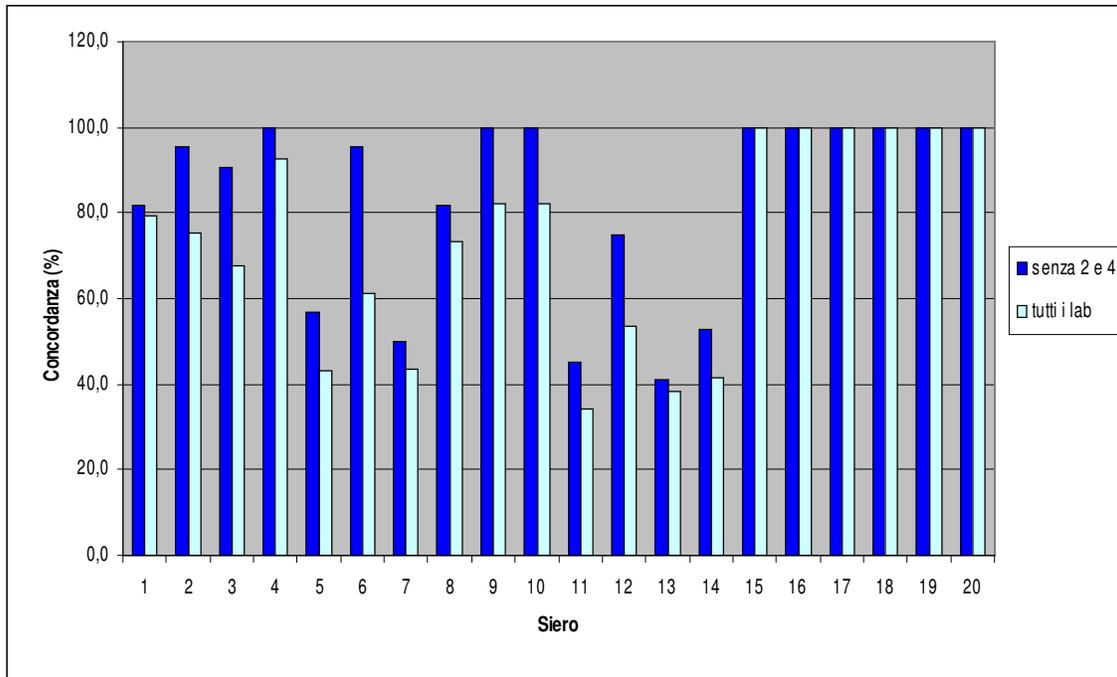
3.8.3 Concordanza secondo Langton e COR

La riproducibilità qualitativa è stata valutata calcolando la concordanza media per siero secondo quanto proposto da Langton [4]. Mettendo in relazione l'accordanza e la concordanza tramite la formula della COR abbiamo valutato ulteriormente la variabilità interlaboratorio.

3.8.3.1 Concordanza secondo Langton

La concordanza è, per i dati qualitativi, l'equivalente della riproducibilità ed è definita come la probabilità che lo stesso campione inviato a due laboratori dia lo stesso risultato. Si può calcolare accoppiando ciascun risultato per un determinato siero con tutti i risultati, per quel siero, ottenuti dagli altri laboratori. In figura 5 sono mostrati i valori medi di concordanza per ogni siero tra tutti i laboratori e quelli medi escludendo i due laboratori con prove non validabili. Per la maggior parte dei sieri la concordanza calcolata sui 7 laboratori è più alta rispetto a quella calcolata su tutti i laboratori, in tre casi (siero 4,9,10) la concordanza epurata dalle prove non valide arriva al 100%. Per i sieri negativi invece è risultata pari al 100% in entrambi i gruppi.

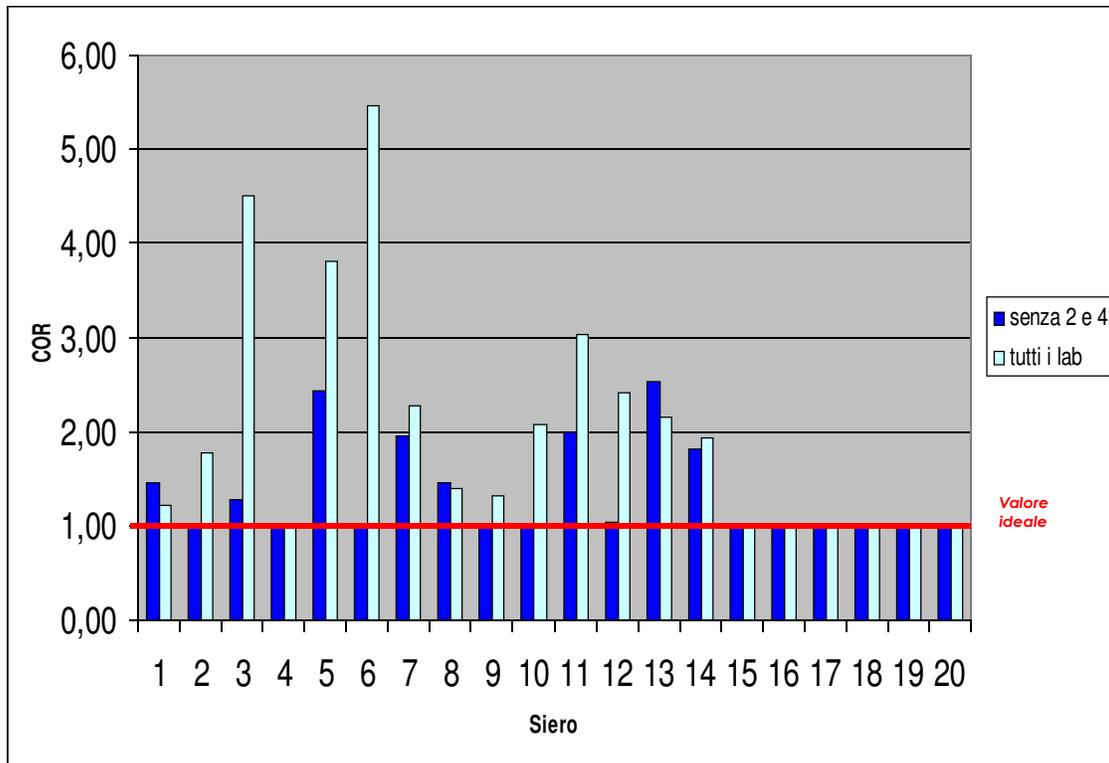
Figura 5: Valori medi di concordanza per ogni siero tra tutti i laboratori confrontati con quelli medi escludendo i laboratori 2 e 4.



3.8.3.2 COR (Concordance odds ratio)

Possiamo stimare ulteriormente la variabilità tra i laboratori confrontando i valori di accordanza e concordanza. Logicamente, se la concordanza è minore dell'accordanza si può dedurre che vi sia una variabilità interlaboratorio maggiore di quella intralaboratorio, cioè che un campione analizzato all'interno dello stesso laboratorio ha più probabilità di dare lo stesso risultato rispetto a quando viene analizzato in laboratori diversi. Visto che sia la concordanza che l'accordanza sono fortemente dipendenti dalla sensibilità (che comunque nel nostro caso è risultata essere pari al 100%), è utile calcolare il COR, meno influenzata dal livello di sensibilità. Il valore di COR può essere interpretato come la probabilità relativa di ottenere lo stesso risultato quando un campione analizzato nello stesso laboratorio rispetto a quando è analizzato in laboratori diversi. Il valore ottimale di COR dovrebbe essere più vicino possibile ad 1. Valori maggiori o minori di 1 indicano rispettivamente una maggiore o minore variabilità interlaboratorio rispetto alla intralaboratorio. In figura 6 sono mostrati i valori COR per ogni siero tra tutti i laboratori e quelli escludendo i due laboratori con prove non validabili. Nella maggioranza dei casi i valori di COR si avvicinano sensibilmente ad 1 se si escludono i laboratori con prove non validabili. In particolare per il siero 6 la COR passa da 5,47 a 1,01; per il siero 12 da 2.42 a 1.03. Per i sieri negativi invece è risultata pari a 1 in entrambi i casi.

Figura 6: Valori di COR (Concordance Odds Ratio) per ogni siero tra tutti i laboratori confrontati con quelli medi escludendo i laboratori 2 e 4.



3.8.4 K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto

In tabella 10 sono mostrati i valori di K considerando tutti i laboratori ed escludendo i laboratori con prove non validabili. Questa concordanza, a differenza delle precedenti, non viene calcolata considerando l'atteso ma stima solo quanto i laboratori siano concordi tra loro nell'espressione dei risultati.

Tabella 10: Valore di K tra tutti i laboratori ed escludendo i laboratori 2 e 4.

K	senza 2 e 4	tutti i lab
	0,72	0,60

Prendendo in considerazione il valore 0,72, questo risulta, secondo la tabella proposta da Landis et al., interpretabile come accordo sostanziale, indicando quindi una buona riproducibilità.

CONCLUSIONI

Il test ha mostrato di possedere le caratteristiche di idoneità per lo scopo prefissato. Si è dimostrato stabile in quanto le DO dei controlli di reazione si sono mantenuti costanti nel tempo in cui sono state eseguite le tre prove.

Riguardo all'accuratezza del test si è dimostrata adeguata, in quanto:

- la sensibilità e la specificità sono risultate pari al 100%, indicando ottime qualità diagnostiche;
- i valori di K di Cohen e di K multiplo indicano un accordo da sostanziale a quasi perfetto rispetto all'atteso.

La ripetibilità quantitativa può essere valutata come buona in quanto:

- il CV tra le coppie di sieri all'interno di ogni prova, considerando il PI dei sieri positivi, si è mostrato inferiore al 20 % nella quasi totalità dei casi;
- l'accordanza, indice di valutazione della ripetibilità qualitativa, si può ritenere soddisfacente in quanto prossima al 100% per più della metà dei sieri.

Per la riproducibilità qualitativa possiamo giungere alle stesse conclusioni in quanto:

- i CV per ogni siero all'interno di ogni laboratorio considerando le tre prove insieme e il CV di ogni siero tra tutti i laboratori e tutte le prove, si sono mostrati, nella quasi totalità dei casi, inferiore al 20 %;
- i valori di concordanza secondo Langton, come per l'accordanza, sono prossimi al 100% per più della metà dei sieri;
- la COR è risultata essere prossima ad uno per tutti i sieri ad eccezione di due, per i quali comunque risultava essere al massimo 2,53;
- il valore di K secondo Quatto è risultato essere 0,76, indice di un accordo sostanziale.

Anche se per l'accordanza e la concordanza sono stati ottenuti valori minimi di 61,14% e 41,3 % rispettivamente, è da sottolineare che questi valori sono conseguenti non ad una classificazione errata tra positivo e negativo ma ad una diversa classificazione di intensità di positività; infatti si ribadisce che sia la sensibilità che la specificità sono pari al 100%.

Si può pertanto concludere che tutti i parametri valutati per questo test (accuratezza, ripetibilità e riproducibilità) hanno dato risultati molto soddisfacenti. Tuttavia, per soddisfare completamente i criteri di validazione OIE, il lavoro dovrà essere integrato sottoponendo ad analisi un maggior numero di sieri di campo e verificando la specificità del metodo anche con campioni positivi per altri flavivirus circolanti nel nostro territorio (Usutu virus).

ATTIVITÀ SVOLTA PER MALATTIA DI BORNA

Preparazione dell' antigene per la produzione di anticorpi monoclonali e sieri sperimentali

Il monostrato cellulare di due flask da 150 cm² di C6 infette da BDV è stato lavato con PBS e le cellule sono state rimosse meccanicamente con cell scraper. Le cellule raccolte sono state risospese in 10 ml di PBS, centrifugate a 1500 rpm x 40' ed il pellet ottenuto risospeso in 2,5 ml di PBS/flask è stato sottoposto ad un ciclo di congelamento e scongelamento e stoccato in congelatore a - 70° C.

Produzione di sieri immuni di ratto e di materiale patologico

Per la produzione di sieri immuni, sono stati utilizzati in totale 30 ratti. Gli animali sono stati infettati sperimentalmente utilizzando differenti vie di inoculazione con l'antigene sopra descritto come di seguito riportato:

10 ratti infettati per via intramuscolare con 0,2 ml/ratto;

5 ratti infettati per via intracerebrale con 0,1 ml/ratto;

5 ratti infettati per via intraperitoneale con 0,2 ml/ratto;

5 ratti infettati per via intranasale con 0,2 ml/ratto;

5 ratti infettati per via sottocutanea con 0,2 ml/ratto;

I prelievi ematici sono stati eseguiti il giorno dell'infezione e a 45 e 70 giorni post-infezione (p.i.).

Per la produzione di materiale patologico, 2 ratti per gruppo sono stati sacrificati 45 giorni p.i. e 3 ratti a 70 gg p.i. e da ogni animale è stato prelevato il fegato ed il cervello.

Il controllo sierologico per la verifica della presenza di anticorpi anti-BDV nei sieri sperimentali prodotti, ha evidenziato come positivi i campioni prelevati a 45 e 70 gg p.i. dai ratti infettati per via intramuscolare ed intracerebrale. Questi sieri sono stati utilizzati per la messa a punto di un test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi anti-BDV.

Anticorpi monoclonali

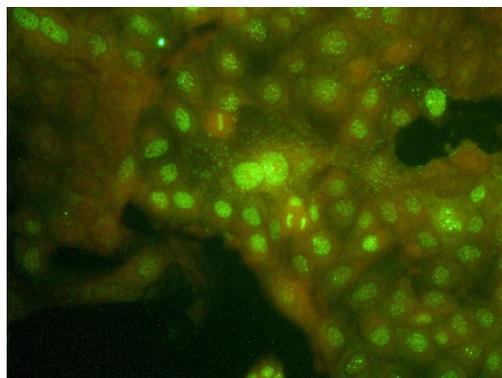
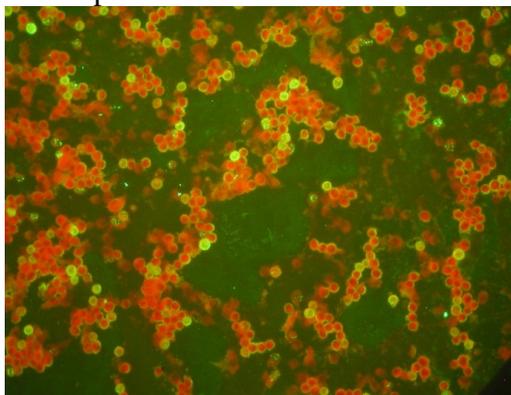
Topi Balb/c sono stati immunizzati mediante inoculazione intraperitoneale con 0,5 ml di Ag BDV seguita dopo 30 giorni da una seconda inoculazione intraperitoneale. Tre giorni dopo, gli splenociti murini sono stati ibridizzati con cellule di mieloma murino NS0 in presenza di PEG 4000 secondo metodica standardizzata.

Lo screening degli ibridomi ottenuti è stato eseguito mediante immunofluorescenza indiretta (IF) su linea cellulare C6 ed RK13 infetta e non infetta allo scopo di verificare la specificità di legame.

Sulla base della reattività in IF sono stati selezionati 6 ibridomi reattivi per BDV.

La reattività dei Mabs è stata valutata allestendo una serie di reazioni di tipo ELISA competitiva, volte a valutare la competizione reciproca tra i MAbs e sieri di ratto immuni prodotti tramite infezioni sperimentali.

I MAbs per i quali il legame all'antigene era inibito dai sieri di ratto immuni erano scelti come candidati per l'allestimento della reazione ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi anti-WNV.



Immunofluorescenza su monostrato RK13 e C6 infetto con BDV.

MAbs	ELISA competitiva con sieri sperimentali di ratto	IF BDV (C6)	IF BDV (RK13)	IF C6/RK13
1C6	+	+	+++	-
1D9	+	+++	+++	-
2C9	+	+	-	-
2F6	+	++	+	-
3D1	+	+	+	-
3A4	+	++	-	-

Sulla base dei risultati ottenuti sono stati selezionati 3 MAbs (1C6, 2F6, 1D9). Questi sono stati prodotti e purificati in concentrazioni utili per la marcatura con perossidasi e l'allestimento del test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi anti-BDV.

Clonaggio degli ibridomi, produzione di MAbs concentrati e marcatura

I tre ibridomi selezionati, produttori anticorpi reattivi verso l'antigene virale desiderato, sono stati clonati mediante diluizione limite.

I cloni sono stati cresciuti in coltura e le IgG murine purificate mediante cromatografia di affinità e coniugate con perossidasi.

Con le possibili combinazioni di MAbs, rispettivamente adsorbiti come anticorpi di cattura e coniugati sono state allestite reazioni ELISA di tipo sandwich. La coppia di MAbs 2F6 / 1D9 rispettivamente utilizzati come anticorpo di cattura e coniugato ha fornito i migliori risultati ed è stata selezionata per l'allestimento di un test ELISA competitivo per la ricerca di anticorpi anti-BDV.

ELISA COMPETITIVA PER LA RICERCA DI ANTICORPI ANTI BDV

Preparazione dell'antigene

Il ceppo BDV è stato cresciuto amplificando la linea C6 infetta con BDV. La coltura cellulare precedentemente sottoposta ad un ciclo di congelamento-scongelamento è stata aggiunta di Betapropriolattone 0,05% (v/v) e lasciata una notte a 4°C e 2 h a 37°C prima di essere chiarificata mediante centrifugazione 4000 rpm per 30'. L'antigene così ottenuto è stato aliquotato e stoccato in congelatore a - 20° C pronto per essere e titolato e successivamente utilizzato.

Test ELISA

La reazione prevede una pre-incubazione dell'antigene al titolo d'uso con un egual volume di siero in esame alla diluizione 1/5 - 1/10 utilizzando una apposita piastra di lavoro.

Dopo l'incubazione di 1h a 37°C, 50 µl della miscela siero-antigene viene trasferita in una piastra NUNC-Maxisorp precedentemente sensibilizzata con il MAb 2D6 diluito in tampone carbonato-bicarbonato pH 9,6 per una notte a 4°C.

Dopo incubazione per 1h a 37°C e successivamente al ciclo di lavaggi viene aggiunto in ciascun pozzetto 50 µl di MAb 1D9 coniugato con perossidasi. In seguito ad una ulteriore incubazione nelle medesime condizioni viene distribuita la soluzione cromogena OPD (Orto-Phenil-Diaminobenzidina) ed eseguita la lettura tramite spettrofotometro con filtro a 492 nm. Il risultato è espresso come percentuale di inibizione rispetto alla reazione di controllo.

Oltre ai sieri di ratto prodotti sperimentalmente, il test ELISA sviluppato è stato utilizzato per testare 11 sieri equini forniti dal Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini dell'IZS di Roma 8 dei quali positivi per anticorpi anti-BDV tramite immunofluorescenza indiretta (IFI) con titoli anticorpali compresi tra 1/40 e 1/1280. Il test ELISA competitivo messo a punto ha permesso di identificare correttamente solo due dei tre sieri positivi ad alto titolo (positivi ad alto titolo anche in Elisa), mentre ha mostrato una reattività scarsa (solo alla diluizione 1/5) o nulla per gli altri sieri.

I monoclonali riconoscono epitopi conformazionali e non sono idonei alla reazione immunoistochimica, questo è stato provato con cellule infette (C6) fissate in formalina per questo motivo non si è potuto utilizzarli ai fini dello sviluppo delle fasi relative alla messa a punto e validazione di detti metodi.

In assenza di un metodo ELISA per la verifica sul campo della circolazione virale di BDV, è stata predisposta ed attuata un'indagine sierologica, mediante l'impiego del test di immunofluorescenza (per la procedura d'esame si veda l'allegato 6 del progetto) indiretta su equidi mantenuti nelle Provincie Autonome di Trento e Bolzano del quale si riporta di seguito il protocollo di studio.

Protocollo di indagine per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus della Malattia di BORNA in equidi delle province di Trento Bolzano ed Udine

Obiettivi

L'obiettivo generale dell'indagine è costituito dalla verifica dell'eventuale presenza di infezione da Virus della Malattia di BORNA in equidi residenti in aree del territorio Nazionale sino ad oggi ritenute indenni ma a rischio di introduzione dell'infezione per contiguità geografica con l'Austria, Paese nel quale negli ultimi anni è stata confermata la presenza del virus nei cavalli.

Per raggiungere tale obiettivo verrà condotto uno studio pilota finalizzato a rilevare la presenza di sieropositività nei confronti della infezione da Virus della Malattia di BORNA negli equidi delle province di Trento, Bolzano ed Udine. Trattandosi di uno studio condotto mediante diagnosi indiretta, i risultati ottenuti avranno carattere presuntivo rispetto alla reale e pregressa circolazione virale in queste Province. Tuttavia, la dimostrazione della presenza di sieropositività, sporadiche o diffuse, potrà fornire utili elementi di valutazione circa l'opportunità di condurre studi più approfonditi che abbiano come scopo la stima della sieroprevalenza per virus BORNA e l'eventuale adozione di misure di monitoraggio e sorveglianza basate su idonei criteri di rappresentatività per le popolazioni di equidi residenti nelle tre Province.

In conclusione, l'obiettivo specifico del presente studio pilota verrà raggiunto attraverso la selezione di un campione di equidi sottoposti a controllo sierologico nel 2009 nell'ambito delle attività previste dal Piano di sorveglianza nazionale per l'anemia infettiva degli equidi, che verrà analizzato anche per la presenza di anticorpi nei confronti del Virus della Malattia di BORNA.

Metodi

Popolazione target

Dai dati desunti dal Database 2007 dell'Anemia Infettiva detenuto dal CRAIE di Pisa, unica fonte dati verosimilmente completa e rappresentativa della reale numerosità della popolazione di equidi presente (non essendo ancora disponibile un'anagrafe equina nazionale), è possibile stimare la seguente popolazione di riferimento per le Province di Trento e Bolzano ed Udine:

Tabella 1.

Provincia Numero equidi testati AIE 2007

Numero di Insediamenti	Equidi testati
TN 257	670
BZ 192	1.156
UD 616	2.402
Totale 1.065	4.228

Per raggiungere più facilmente gli scopi dello studio, risulta particolarmente importante concentrare i controlli sierologici tra gli equidi maggiormente a rischio di esposizione per una eventuale infezione da virus BORNA, ossia i capi detenuti in condizioni **“rurali”**, soggetti con **possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto e stanziali**. In effetti, al fine di poter ascrivere le eventuali sieropositività riscontrate ad infezioni

effettivamente avvenute in loco e quindi poter ipotizzare induttivamente una effettiva circolazione virale, è fondamentale procedere al controllo sierologico di *equidi residenti stabilmente* da più anni e non soggetti a movimentazione (per allenamento, competizioni ecc.).

Non essendo tuttavia possibile ricostruire la storia residenziale degli equidi presenti nelle 2 Province sulla base del Database AIE, risulta necessario delegare la scelta dei soggetti da campionare agli operatori che hanno effettiva conoscenza del territorio, sulla base di una valutazione sicuramente arbitraria ma certamente più circostanziata e adeguata alle finalità dello studio.

La scelta di operare il controllo, prioritariamente, su equidi detenuti in condizioni rurali e/o all'aperto è basata sulle evidenze prodotte da alcuni studi condotti in Europa i quali descrivono il possibile ruolo quale serbatoio del virus di un roditore - **crocidura ventrebianco** (*Crocidura leucodon*) -, mammifero soricomorfo della famiglia dei Soricidi, diffuso in Europa e presente anche in Italia (*Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. Hilbe M et al. - Emerg Infect Dis. 2006 Apr;12(4):675-7*).

Campionamento

Assunti

Sulla base dei denominatori riportati in Tabella 1, per ogni Provincia viene calcolato un campione necessario a rilevare, con una probabilità del 95%, almeno un equide positivo nel caso la prevalenza reale di soggetti positivi sia pari o superiore al 2% (Ipotesi nulla). Nel caso nessun soggetto risulti positivo si potrà concludere, accettando l'ipotesi alternativa, che la prevalenza dell'infezione è inferiore al 2%.

In ogni caso, la numerosità campionaria calcolata (Tab 2.) potrà consentire di operare una stima, seppure grezza, della prevalenza, utile a fini conoscitivi.

Campione

Sulla base di tali assunti è stato quindi calcolato il seguente campione di equidi da sottoporre ad esame sierologico per BORNA, su base provinciale:

Tabella 2: campione di equidi da testare (LC 95% - soglia di prevalenza >2%)

Provincia	Denominatore (Pop. Target)	Numerosità campionaria (equidi da testare)
TN	670	137
BZ	1.156	140
UD	2.402	144
Totale	4.228	421

Criteria di selezione degli equidi da testare

Come specificato in precedenza, ai fini del raggiungimento della numerosità campionaria richiesta, dovranno essere selezionati equidi:

- detenuti in condizioni **“rurali”**
- con **possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto**
- **residenti stabilmente**

La selezione dei campioni aventi tali caratteristiche sarà operata direttamente dagli operatori delle Sedi provinciali sia sui sieri già stoccati per AIE, sia su sieri di nuovo conferimento nell'ambito del Piano AIE 2009, avendo l'accortezza di distribuirli in maniera uniforme rispetto alle aziende (strutture) presenti sui rispettivi territori di competenza nonché all'area di provenienza (comune).

Dovrà essere selezionato un numero massimo di 4 sieri (equidi) per azienda.

Nota: in questa fase, la randomizzazione dei soggetti da campionare non viene ritenuta fondamentale, in quanto lo scopo è limitato alla verifica della presenza della infezione, privilegiando le categorie di equidi potenzialmente più a rischio (categorie per le quali la possibilità teorica di reclutare soggetti positivi è maggiore). Si tratta quindi di operare nell'ambito del "migliore scenario" possibile al fine del reclutamento dei "casi". Tale scenario, quindi, rappresenta un approccio conservativo in grado di offrire le maggiori probabilità di individuare la presenza dell'infezione e, in caso di completa negatività del campione, di poter escludere la sua presenza con un elevato livello di confidenza.

Un approccio più sistematico potrà essere invece utilizzato in un eventuale studio successivo finalizzato alla stima della sieroprevalenza territoriale, attraverso l'adozione di un appropriato disegno dello studio in grado di garantire piena rappresentatività del campione.

Schede di prelievo dei campioni.

Per ogni campione o serie di campioni (max 4 per azienda) provenienti da una singola azienda dovrà essere compilata, anche a posteriori nel caso dei sieri già stoccati presso le Sedi provinciali, la scheda accessoria in allegato. Tale scheda dovrà essere allegata alla scheda di riferimento ufficiale già compilata per Anemia Infettiva Equina (AIE). Ciò al fine di poter procedere alla raccolta degli attributi aziendali relativi ai cavalli sottoposti a prelievo anche per la ricerca di anticorpi per il virus di BORNA.

RISULTATI

Il campione testato è di 277 sieri di cavalli raccolti nell'ambito del Piano AIE 2009/2010. Di questi 137 provengono dalla Provincia Autonoma di Trento e 140 dalla Provincia Autonoma di Bolzano.

Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana.

Il lavoro da noi condotto rappresenta una delle più estese ricerche sierologiche attuate per Borna effettuate sul territorio del Trentino Alto Adige. Solo un precedente studio eseguito da Codazza e collaboratori (Codazza D. & Nativi D. 2005) con l'utilizzo di tre metodi di ELISA per la ricerca degli Ab dell' Ag e degli immunocomplessi ha testato una piccola quota di cavalli in tali aree.

Tutti i 277 sieri testati (di cui 137 prelevati in provincia di Trento e 140 in provincia di Bolzano) sono risultati **negativi** per anticorpi nei confronti di Borna virus con il metodo impiegato.

Il risultato ottenuto permette di escludere la diffusione dell'infezione nelle aree sottoposte ad indagine con prevalenze massime superiori al 1.04% (limite di confidenza del 95%). Tale risultato contrasta con le osservazioni di Codazza et al. che riportano valori medi nazionali del 20-40% di positività in popolazioni di equidi asintomatici.

Obiettivi:

Al termine del corso i partecipanti avranno migliorato le loro conoscenze:

- Sulle infezioni virali a carico del sistema nervoso centrale del cavallo, sulla loro epidemiologia, la diagnosi clinica, istopatologica e di laboratorio
- Sulla responsabilità professionale e sulla gestione delle emergenze connesse all'accertamento di alcune infezioni a carattere zoonosico

Destinatari:

Veterinari di Sanità Pubblica e Libero Professionisti, ricercatori delle Università e degli IIZZSS.

Le modalità di partecipazione sono riportate nella scheda di iscrizione

Enti organizzatori:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana
Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche
Federazione Italiana Sport Equestri
Ordine dei Medici Veterinari della Provincia di Roma
Ordine dei Medici Veterinari della Provincia di Milano
Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Milano

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

*Formazione, Comunicazione e Documentazione
IZS Lazio Toscana*

Via Appia Nuova, 1411 00178 ROMA
tel. 06.79099421/463; fax 06.79099459; 06.79340724
e-mail: formazione@izslt.it; <http://www.izslt.it>

Con il contributo di:

FORT DODGE – Research and Development



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE REGIONI
LAZIO E TOSCANA



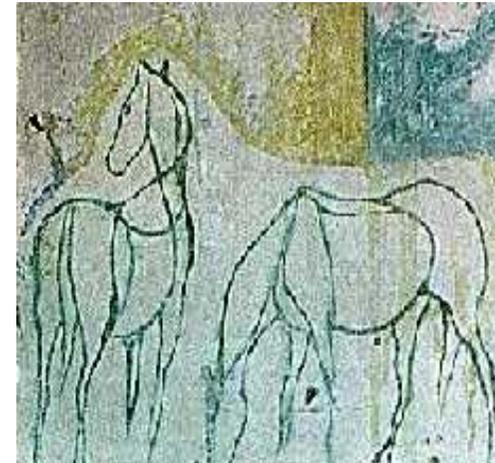
ELSE



ORDINE DEI MEDICI
VETERINARI PROVINCIA
ROMA

Fondazione
Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche

NEUROPAATOLOGIE DI ORIGINE VIRALE DEGLI EQUINI



IZS Lazio e Toscana – Da dipinto a muro di Enzo Rossi (anni '50)

Milano 13 ottobre – Palazzo delle Federazioni sportive
Aula Congressi, C.O.N.I., Via G.B. Piranesi 44 b

Roma, 15 ottobre - Palazzo delle Federazioni, C.O.N.I.
Aula Auditorium, Viale Tiziano, 74



2 crediti per veterinari

PROGRAMMA

09:00 Registrazione dei partecipanti e consegna documentazione

09.30: Apertura dei lavori

Nazareno Renzo Brizioli - Direttore Generale Istituto Zooprofilattico Sperimentale Regioni Lazio e Toscana (IZS LT)

Sono stati invitati:

Romano Marabelli – Direttore Generale Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria, Alimenti e Nutrizione, Ministero della Salute

Cesare Croce - Presidente F.I.S.E

Marco Pepe - Presidente Società Italiana Veterinari per Equini

Donatella Loni - Presidente Ordine Veterinari della Provincia di Roma

Carla Bernasconi - Presidente Ordine Veterinari della Provincia di Milano

Sessione scientifica

Chair persons: *Gian Luca Autorino* (Roma); *Giorgio Poli* (Milano);
Fabio Del Piero (University of Pennsylvania, USA)

10.00: **Patogenesi ed epidemiologia dei casi neurologici sostenuti da herpesvirus 1 dell'equino (EHV -1)** – Pathogenesis and epidemiology of EHV- 1 neurological disease
Ken Smith, Animal Health Trust, Newmarket (UK)

10.45: **EHV- 1: recenti acquisizioni su immunità e vaccinazioni** – EHV – 1: recent advances in our understanding of immunity and vaccination
Duncan Hannant and *Julia Kydd*, School of Veterinary Medicine and Science University of Nottingham, UK

11.30: Pausa

12.00: **Borna disease: un problema attuale? Le principali caratteristiche dell'infezione nel cavallo** – Borna disease: a real threat? Main features of the infection in the horse and recent developments in research.

Norbert Nowotny, Clinical Department of Diagnostics, University of Veterinary Medicine, Vienna

12.45: Discussione

13.00: Pausa

Chair persons: *Duncan Hannant* – *Norbert Nowotny*

14.00: **Distribuzione, segni clinici, patogenesi, lesioni e diagnosi delle encefalomieliti virali equine negli USA** – Distribution, signs, pathogenesis, lesions and diagnoses of viral equine encephalomyelitis in USA

Fabio Del Piero, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, USA

14.45: **L'istopatologia come strumento di diagnosi delle infezioni del sistema nervoso centrale del cavallo** – Histopathology as an instrument in the differential diagnosis of the central nervous system of the horse

Carlo Cantile, Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Pisa

15. 30: **Il progetto: Sviluppo di metodi diagnostici per la sorveglianza delle neuropatologie di origine virale degli equini** – The project: development of diagnostic methods for the surveillance of equine viral neuropathologies

Gian Luca Autorino, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Roma

15.45: Discussione e Conclusioni

16.00: Compilazione del questionario di uscita



Pathogenesis and Epidemiology of EHV-1 Neurological Disease

*Ken Smith, +Josie Nugent, *Julia Kydd and ^Nick Davis-Poynter*

*Royal Veterinary College,
+Animal Health Trust,
*University of Nottingham
and ^University of Queensland*



EHV-1 Neurological Disease

- The equine herpesviruses
- Clinical signs and transmission of EHV-1 infection
- Pathogenesis of EHV-1 infection
- Molecular epidemiology of EHV-1 infection
- Summary and conclusions

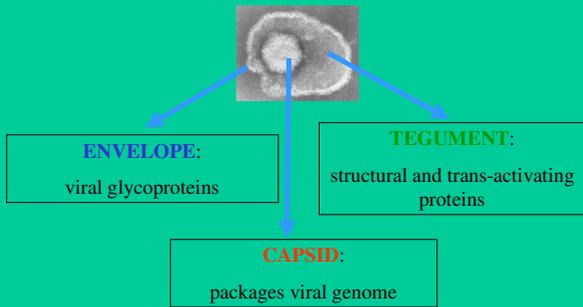
EHV-1 Neurological Disease

- The equine herpesviruses
- Clinical signs and transmission of EHV-1 infection
- Pathogenesis of EHV-1 infection
- Molecular epidemiology of EHV-1 infection
- Summary and conclusions

Equine herpesviruses

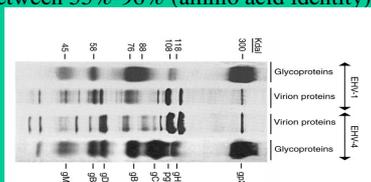
- EHV-1, EHV-4
 - alphaherpesvirus (*varicellovirus*), cf. VZV
 - respiratory infection, abortion, paralysis (EHV-1)
- EHV-3
 - alphaherpesvirus (*simplexvirus*), cf. HSV-1, -2
 - genital infection (coital exanthema)
- EHV-2, -5
 - gammaherpesvirus, cf. HHV-8, AHV-1
 - respiratory infection
 - capacity for immune evasion

Equine herpesvirus structure



Genetic homology of EHV-1 and EHV-4

Closely related genetically and serologically
 – each encode 76 recognised genes: conservation between 55%-96% (amino acid identity)



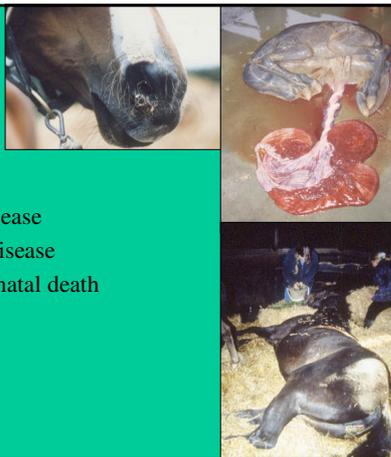
There is cross-protection between EHV-1 and EHV-4

EHV-1 Neurological Disease

- The equine herpesviruses
- Clinical signs and transmission of EHV-1 infection
- Pathogenesis of EHV-1 infection
- Molecular epidemiology of EHV-1 infection
- Summary and conclusions

EHV-1 disease syndromes

- Respiratory disease
- Neurological disease
- Abortion / neonatal death



EHV-1 disease syndromes

Respiratory disease

- EHV-1 & EHV-4
- fever
- depression
- nasal discharge
- filled legs
- tracheal neutrophilia



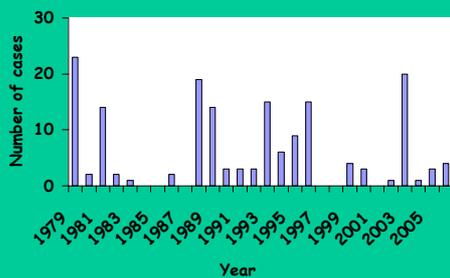
EHV-1 disease syndromes

Neurological disease

- More common in pregnant or suckling mares than horses in training
- incontinence
- paralysis



Prevalence of EHV-1 neurological disease (AHT)



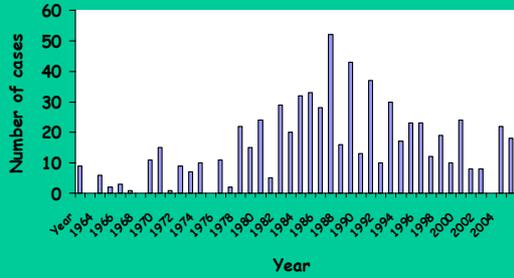
EHV disease syndromes

Abortion/neonatal death

- mainly EHV-1
- last 3rd of pregnancy
- may affect individual mares
- may occur as abortion storms
- can occur despite vaccination
- often linked to yearlings or horses out of training



Prevalence of EHV-1 abortions (AHT)

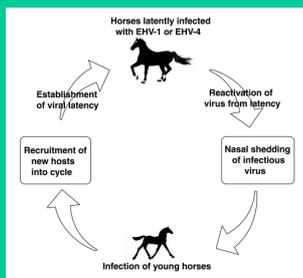


Transmission of EHV-1 Infection

- Exhaled virus from respiratory infections
- Contact with infected fetuses, membranes or fluids
- Reactivation of infection in healthy carrier animals



The cycle of latency and reactivation



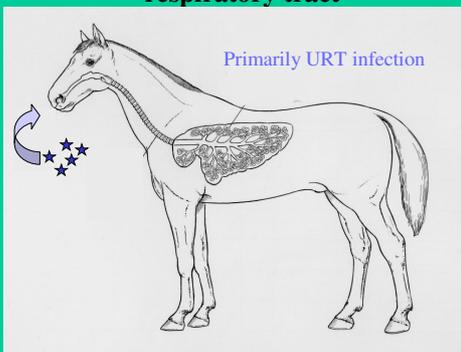
Control of EHV-1 Disease

- Since a large proportion of healthy horses are latently infected with EHV-1 and -4, it is not feasible to prevent infection being introduced onto equine training or breeding premises
- Efforts should be directed towards preventing disease and minimising transmission
 - Early diagnosis of EHV-1 related disease
 - Minimise stress in late pregnancy
 - Minimise contact between mares in late pregnancy and new introductions onto the stud (esp. young stock)

EHV-1 Neurological Disease

- The equine herpesviruses
- Clinical signs and transmission of EHV-1 infection
- Pathogenesis of EHV-1 infection
- Molecular epidemiology of EHV-1 infection
- Summary and conclusions

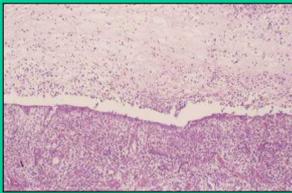
Pathogenesis of EHV-1 infection: respiratory tract



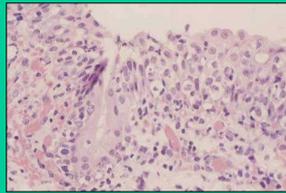
**Pathogenesis of EHV-1 infection:
respiratory tract**



**Large numbers of virus-infected cells are
shed from the upper respiratory tract**

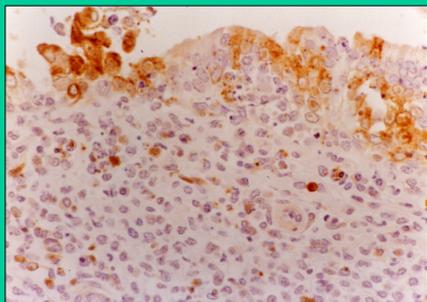


Marked surface exudation

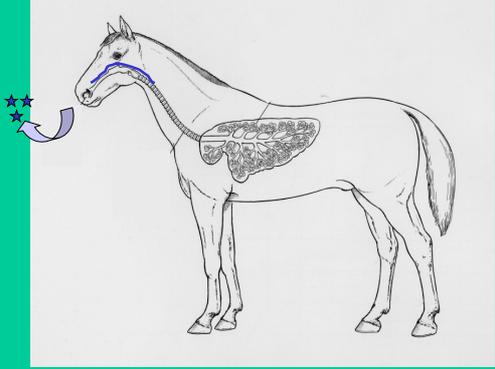


Lymphocytic exocytosis

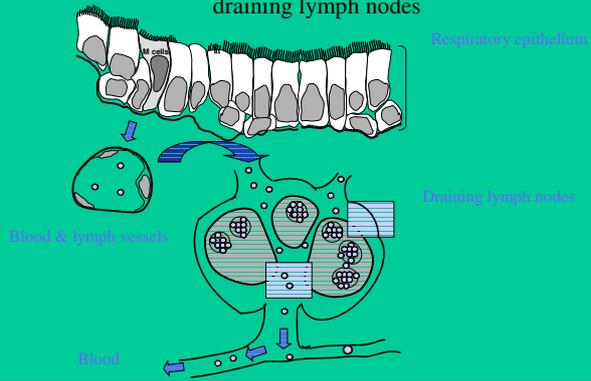
**Large numbers of virus-infected cells are
shed from the upper respiratory tract**



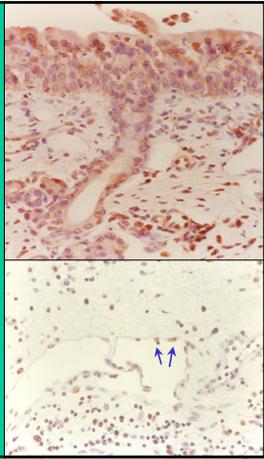
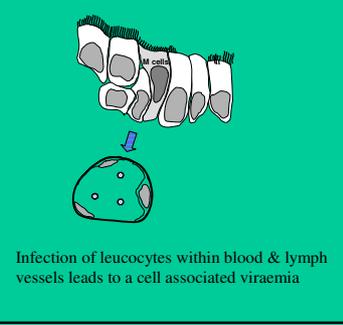
Pathogenesis of EHV-1 infection



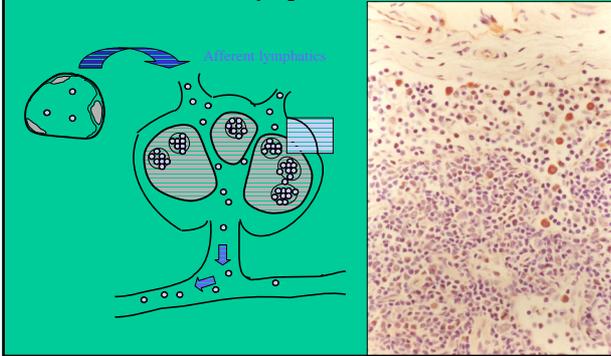
Transfer of virus from the respiratory epithelium to the draining lymph nodes



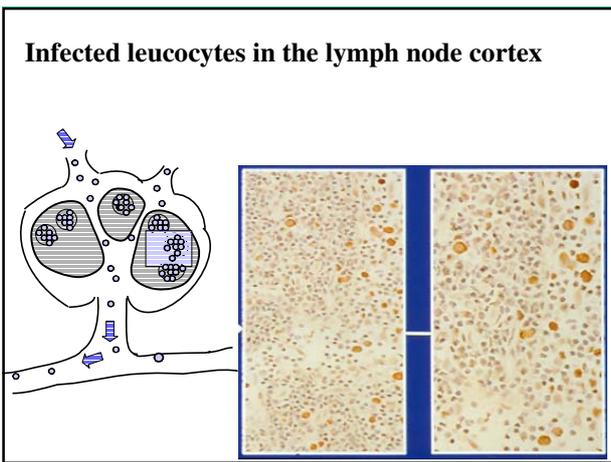
Transfer of infectious virus to the local circulation



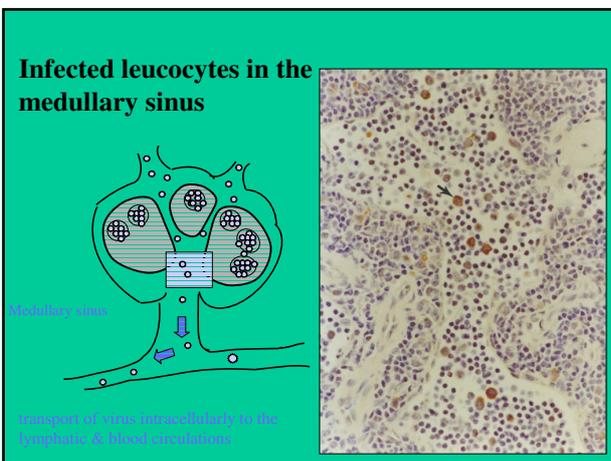
Infected leucocytes draining into the subcapsular sinus of a lymph node



Infected leucocytes in the lymph node cortex



Infected leucocytes in the medullary sinus

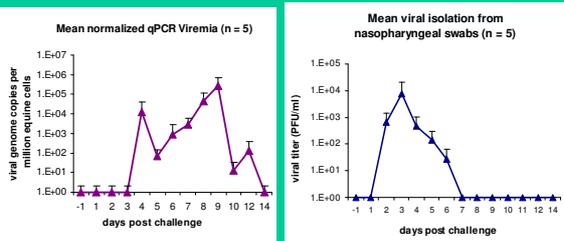


Leucocyte associated viraemia

- using virus isolation, paralytic strains cause higher levels compared with abortigenic isolates
- real-time polymerase chain reaction can now be used to quantify copies of viral DNA in leucocytes

Minford et al 1998; Goodwin et al 2000; Dahlen et al 2006

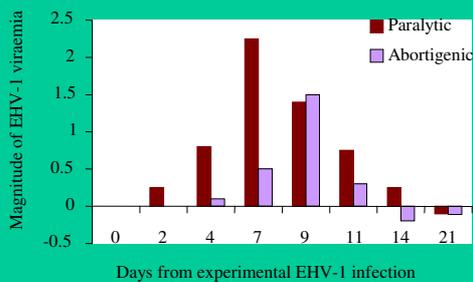
Detection of viral shedding and viraemia by PCR



Neurological signs were observed between days 5 & 12 post-infection.

Goodwin et al., 2006

EHV-1 infected circulating cells can be detected from days 2-21 post infection using virus isolation



Key features of EHV-1 pathogenesis

- Cell associated viraemia transports virus
 - intracellular...
 - beyond the respiratory tract...
 - to sites of secondary replication...



pregnant uterus - central nervous system

Pathogenesis of EHV-1 infection: spinal cord

cell associated viraemia



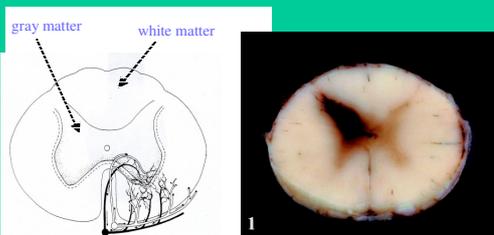
endothelial cells

microvessels with an end circulation



neurological disease

Gross Pathology

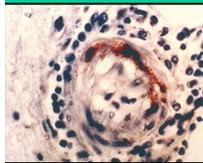


Haemorrhage in the spinal cord

Stierstorfer et al. 2002

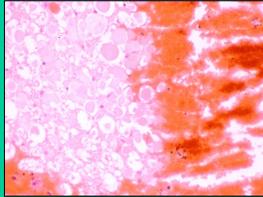
EHV-1 neurological disease: pathogenesis

- * endothelial cell infection of an end circulation causes...
- * vasculitis and / or haemorrhage and / or thrombus formation...
- * leads to ischaemic damage to the neurones



Ischaemic damage to neurones of the spinal cord

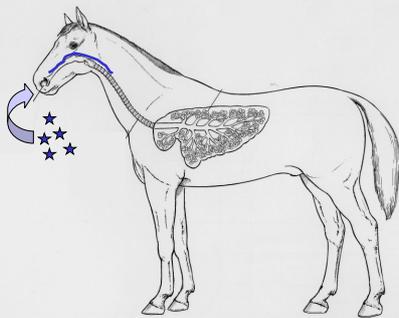
Axonal swelling and microscopic haemorrhage



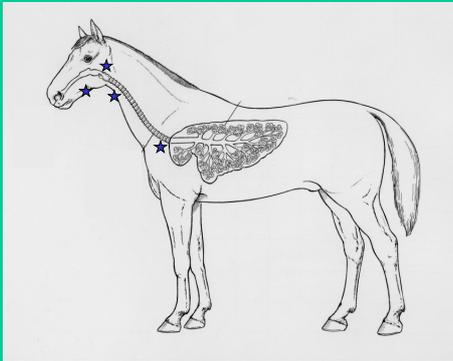
The number of sites and location of the vascular damage will determine the severity of the disease

Summary of EHV-1 pathogenesis

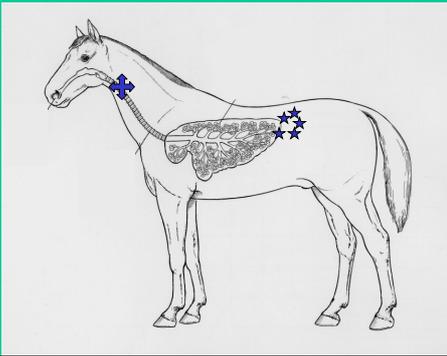
Respiratory tract epithelium is the primary site of viral replication



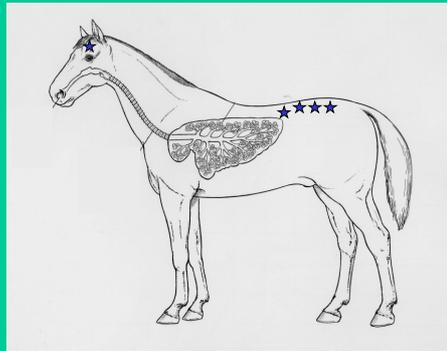
Infectious virus drains to the lymph nodes



Cell associated viraemia transports virus to sites of secondary replication: microvasculature of the pregnant uterus



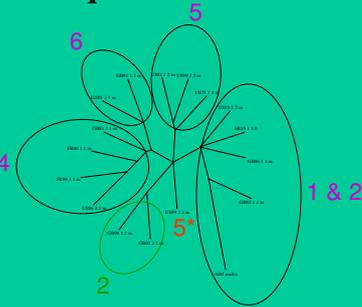
Cell associated viraemia transports virus to sites of secondary replication – microvasculature of the CNS



EHV-1 Neurological Disease

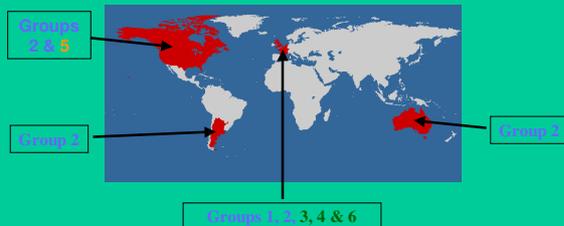
- The equine herpesviruses
- Clinical signs and transmission of EHV-1 infection
- Pathogenesis of EHV-1 infection
- Molecular epidemiology of EHV-1 infection
- Summary and conclusions

EHV-1 strains can be grouped by DNA sequence



This enables EHV-1 strains to be tracked between outbreaks

Geographical distribution of strain groups



- Group 2 – widespread distribution
- Group 5 – predominantly N. America
- Groups 3, 4 & 6 – predominantly Europe

EHV-1 strains causing paralysis have a specific DNA mutation

Type of outbreak	G ₂₂₅₄	A ₂₂₅₄	Total
Non-paralytic	3	53	56
<i>Percentage</i>	5%	95%	
Paralytic	25	5	30
<i>Percentage</i>	83%	14%	
Total	28	58	86

This will enable more specific diagnostic tests to be developed for paralytic EHV-1 strains

EHV-1 Neurological Disease

- The equine herpesviruses
- Clinical signs and transmission of EHV-1 infection
- Pathogenesis of EHV-1 infection
- Molecular epidemiology of EHV-1 infection
- Summary and conclusions

If EHV-1 paralysis is suspected

- Stop all breeding activities
- Stop all movement on and off the premises for at least 28 days
- Collect appropriate samples for laboratory analysis (heparinised blood samples, nasopharyngeal swabs and/or whole equine carcasses)
- Divide horses into small groups and keep pregnant mares separate from other types of horse
- Do not allow any pregnant mares onto premises until EHV paralysis has been excluded
- Disinfect premises and vehicles
- Screen and clear groups of horses as free from infection before movement resumed
- Review vaccination policy after cessation of outbreak

Thank you

- Romain Paillot
- Richard Newton
- Duncan Hannant
- Jenny Mumford
- George Allen
- Josh Slater
- Klaus Osterreider
- Kerstin Borchers
- Laura Goodman



Equine herpesvirus-1 (EHV-1): Recent advances in our understanding of immunity and vaccination

**Duncan Hannant
& Julia Kydd**

School of Veterinary Medicine and Science, University of Nottingham, UK

Animal Health Trust Newmarket



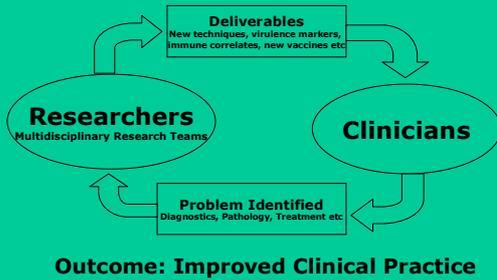
Research Strategy

Axiom:

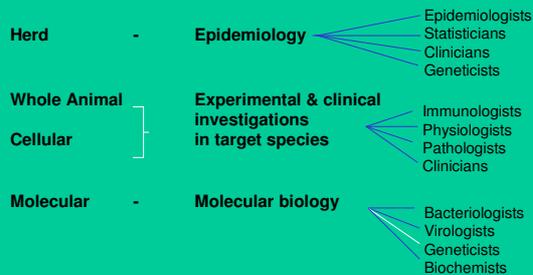
- Current Clinical Practice is derived from advances in Research

Clinical Practice =
Diagnosis
Treatment
Monitoring
Prophylaxis

Integration of Research Themes with Clinical Requirement and Outcome



Approach



**Example:
Equine Herpes Virus 1 (EHV1)
Research**

- Field/epidemiological observations on abortions and respiratory disease outbreaks ✓
- Collection/sequencing of representative viruses ✓
- Molecular identification of abortigenic/paralytic strains ✓
- Pathogenesis studies in horses ✓
- Investigations of immunity (serum Ab, mucosal, CTL) ✓
- Identification of immune correlate (CTLp frequency) ✓
- Identification of target antigens for CTL/ MHC down-regulation ✓
- Application of molecular studies on EHV1 gene products to identify novel vaccine antigens *In progress*

The research problem with EHV-1



Gibson
Chet Atkins Tennessee
1990

Which virological features of EHV-1 require immunological control?

Respiratory tract disease



Nasopharyngeal shedding
Endothelial cell infection
Cell associated viraemia



Abortion
Neurological disease

Aim:

to identify immune responses which protect against the virological signs

The approach has been:

1. to study immune responses which follow experimental infection
2. to induce selected immune responses and test their role in protection against challenge infection
3. to stimulate protective immunity by vaccination

Outline of this presentation

- the effect of EHV-1 on the immune system
 - *in vitro*
 - *in vivo*
- immune responses following experimental EHV-1 infection
 - humoral
 - cellular
- the role of these immune responses in protection

Effects of EHV-1 on the immune system *in vitro*

- virus replicates in stimulated lymphocytes
- stage of cell cycle influences infection
- **MHC class I is downregulated**
- immunosuppression
- dendritic cells are infected (maturation dependent)

Thomson & Mumford 1976; van der Meulen et al 2000; Ellis et al 2003; Ambagala et al 2004; Charan et al 1997; Hannant et al 1999; Szelek et al 1999

EHV1 gene products: effects on equine immune response

Free access on website

I: J Gen Virol. 2003 Feb;84(Pt 2):293-300. Related Articles, Links

FREE full text article at jgv.sgmjournals.org

Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1.

Rappocciolo G, Birch J, Ellis SA.

Department of Immunology and Pathology, Institute for Animal Health, Compton, Newbury, Berkshire RG20 7NN, UK.

There is good evidence that cytotoxic T lymphocytes play an important role in the clearance of equine herpesvirus-1 (EHV1) in horses. We have demonstrated that, in common with other alphaherpesviruses, EHV1 infection can lead to dynamic down-regulation of MHC class I expressions at the cell surface, a common strategy for pathogen evasion of the host immune response. This down-regulation is specific for MHC class I and does not reflect a general shut-off of host-cell protein synthesis. The use of monoclonal antibodies that recognize different MHC class I epitopes has demonstrated that the effect may be allele- or locus-specific. Use of the viral DNA synthesis inhibitor phosphonoic acid, which prevents late viral gene expression, showed that the effect is mediated by an immediate-early or early viral gene, and use of the protein translation inhibitor cycloheximide confirmed that an early gene is primarily responsible. The data indicate that EHV1 infection results in enhanced endocytosis of MHC class I from the cell surface, the only other herpesvirus reported to use this mechanism in human herpesvirus-8. Elucidation of the precise mechanisms used by EHV1 in this process and identification of the genes responsible may lead to improved vaccination strategies.

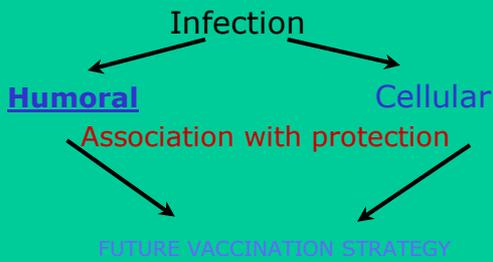
**Effects of EHV-1 on the immune system
*in vivo***

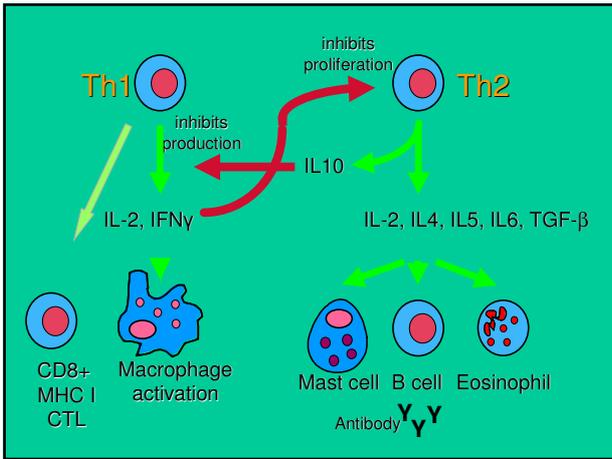
- lymphopaenia & neutropaenia develop
- lymphoblasts increase between days 4-14
- cell associated viraemia (between 1 in 10⁹ to 1 in 10⁷ leucocytes are infected)
- virus infects both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, some B lymphocytes and 20-25% of monocytes
- latency is established in lymphocytes & the trigeminal ganglion
- NB: neutrophils are not infected.

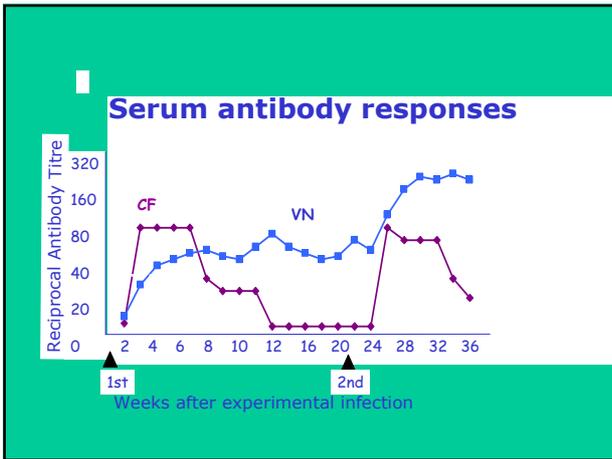
Outline of this presentation

- the effect of EHV-1 on the immune system
 - *in vitro*
 - *in vivo*
- immune responses following experimental EHV-1 infection
 - humoral
 - cellular
- the role of these immune responses in protection

Equine Immune Responses to EHV-1

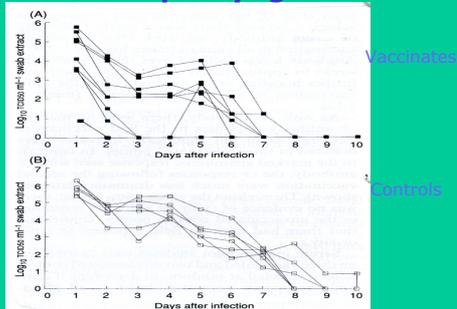






What is the role of systemic VN antibody in protection?

Pre-challenge VN titre of 10^3 reduces nasopharyngeal shedding



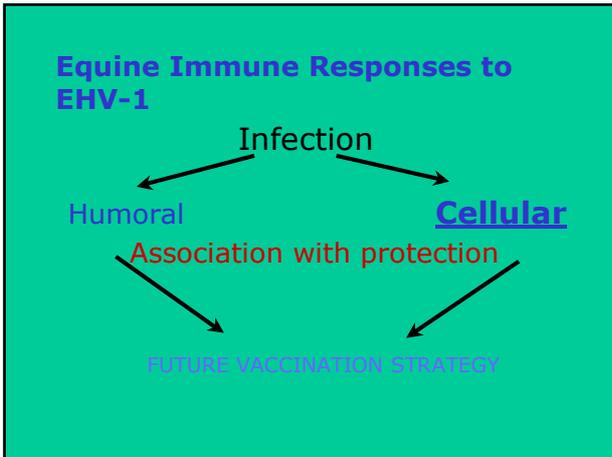
Herbert et al. 2003 - *Vaccine* 21: 2015-2021

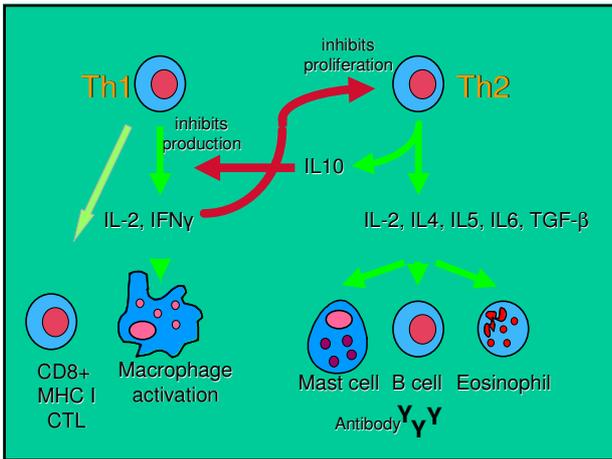
Summary: Role of VN antibody in protection

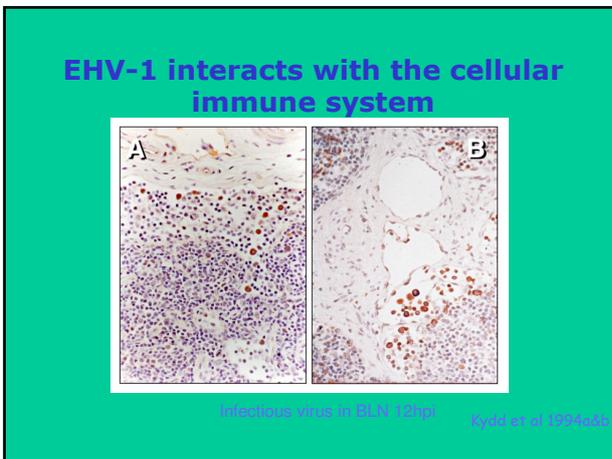
- High titres (\log_{10}^3) of serum VN antibody:
 - reduce the amount and duration of virus shed from the nasopharynx - (population)
 - have no effect on the cell associated viraemia or abortion or neurological disease
 - do not prevent infection (individual)

Is mucosal antibody associated with immunity?

- virus specific antibodies are primarily IgA
- these have neutralising activity *in vitro* - IgA predominant
- this antibody contributes to reduced nasopharyngeal shedding on challenge infection
- the duration is short (weeks) but lengthens on re-exposure
- mucosal Ab is likely to play an important role in the first line of defence







EHV1 infection: T cell responses

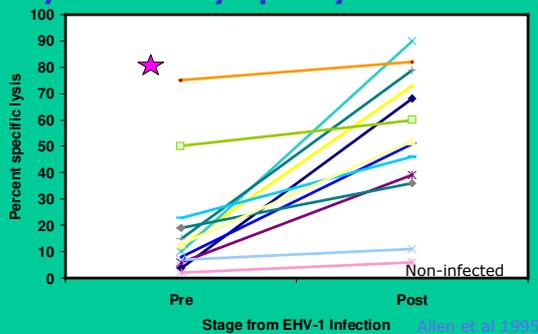
- Transient lymphocytopaenia
- CD4+ lymphocytes in blood and lung ↑
- CD8+ lymphocytes in lung ↑
- CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) ↑
- CD4+ and CD8+ memory cells induced
- Some evidence for immunosuppression

Cytotoxic T Lymphocytes

- KILL EHV-1 INFECTED CELLS
- DO NOT KILL FREE VIRUS

0.5

Cytotoxic T lymphocytes



Characterisation of the CTL response

CTL activity:

- increases after experimental infection
- is MHC class I restricted
- the lysis is mediated by CD8⁺ lymphocytes
- the longevity may be up > 1year – but is perhaps less in younger animals?
- the lysis is not LAK activity
- EHV-1 CTL can be induced by EHV-4
- can be stimulated from cryopreserved PBMC

Correlate of Immunity to EHV1?

- Serum VN and CF antibody? *NO*

Correlate of Immunity to EHV1?

- Serum VN and CF antibody? *NO*
- CD4⁺ proliferative T cell responses? *NO*

Correlate of Immunity to EHV1?

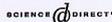
- Serum VN and CF antibody? *NO*
- CD4+ proliferative T cell responses? *NO*
- CD8+ CTL activity? *NO*

Correlate of Immunity to EHV1?

- Serum VN and CF antibody? *NO*
- CD4+ proliferative T cell responses? *NO*
- CD8+ CTL activity? *NO*
- CD8+ CTLp frequency? *YES!!!*

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

ELSEVIER  SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Immunology and Immunopathology xxx (2003) xxx–xxx

Veterinary immunology and immunopathology

www.elsevier.com/locate/vetimm

Pre-infection frequencies of equine herpesvirus-1 specific, cytotoxic T lymphocytes correlate with protection against abortion following experimental infection of pregnant mares

J.H. Kydd¹, E. Watrang¹, D. Hannant

¹Centre for Preventive Medicine, Animal Health Trust, Lammas Park, Kentford, Newmarket, Suffolk, CB8 7UU, UK

Received 14 January 2002; received in revised form 10 July 2003; accepted 4 August 2003

Abstract

In general, vaccines containing inactivated equine herpesvirus-1 (EHV-1) fail to prevent abortion in pregnant mares following infection with a virulent strain of EHV-1. We have tested the hypothesis that resistance to EHV-1-induced abortion in pregnant mares is associated with high frequencies of EHV-1 specific, major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted, cytotoxic T lymphocytes (CTL) in the circulation. To test this theory, three groups of pregnant mares were

Is the frequency of CTLp associated with immunity?

Ponies with:

- HIGH CTLp frequencies show reduced clinical & virological signs
- LOW CTLp frequencies show the typical clinical & virological signs

O'Neill et al 1999

Before we get too excited about this: the obvious questions

- What do EHV1-specific CTLs see on infected cells?
- What is the target antigen for “killing”?

Target antigens for EHV1-specific CTL

- *In vitro* experiments showed that both “late-infected” and “early-infected” cells were killed by CTL (O'Neill *et al* AHT).
- Selective advantage for CTL to kill early infected cells before tissue damage and virus spread occurs.
- Hence, research aims have been to identify the target antigen(s) for CTL

Early expressed EHV1 gene-products are targets for CTL

1: J Gen Virol, 2003 Oct;84(Pt 10):2625-34.

Related Articles, Links

Full text available at
jgv.sgmjournals.org

Identification of equine herpesvirus-1 antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes.

Soboll G, Whalley JM, Koen MT, Allen GP, Fraser DG, Macklin MD, Swain WF, Lunn DP.

Department of Medical Sciences, School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, USA.

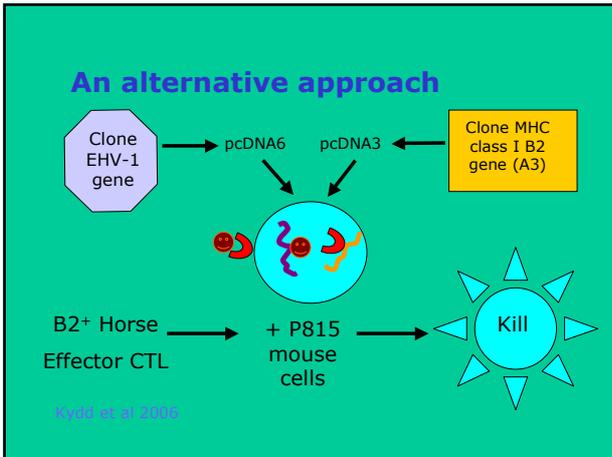
Equine herpesvirus-1 (EHV-1) causes serious disease in horses throughout the world, despite the frequent use of vaccines. CTLs are thought to be critical for protection from primary and reactivating latent EHV-1 infections. However, the antigen-specificity of EHV-1-specific CTLs is unknown. The aim of this study was to identify EHV-1 genes that encode proteins containing CTL epitopes and to determine their MHC I (or ELA-A in the horse) restriction. Equine dendritic cells, transfected with a series of EHV-1 genes, were used to stimulate autologous CTL precursor populations derived from previously infected horses. Cytotoxicity was subsequently measured against EHV-1-infected PWM lymphoblast targets. Dendritic cells were infected with EHV-1 (positive control) or transfected with plasmids encoding the gB, gC, gD, gE, gH, gI, gL, immediate-early (IE) or early protein of EHV-1 using the PowderJect XR-1 research device. Dendritic cells transfected with the IE gene induced CTL responses in four of six ponies. All four of these ponies shared a common ELA-A-A2.1 haplotype. Dendritic cells transfected with gC, gD, gI and gL glycoproteins induced CTLs in individual ponies. The cytotoxic activity was ELA-A-restricted, as heterologous targets from ELA-A mismatched ponies were not killed and an MHC I blocking antibody reduced EHV-1-specific killing. This is the first identification of an EHV-1 protein containing ELA-A-restricted CTL epitopes. This assay can now be used to study CTL specificity for EHV-1 proteins in horses with a broad range of ELA-A haplotypes, with the goal of developing a multi-epitope EHV-1 vaccine. **Full paper is free on JGV site**

What are CTL target antigens?

- EHV-1 encodes 76 genes
- many genes have a negative influence on the immune response e.g. MHC class I downregulation
- therefore, identification of the CTL targets will be beneficial...however

What are CTL target antigens?

- equine MHC class I encodes at least 17 haplotypes
- within each haplotype, at least 4 classical genes are expressed
- CTL target proteins may need to be identified for each gene, or at least the most common MHC genes



EHV-1 Genes Tested

ORF	Function	CTL Target
• 12	tegument	NO
• 14	unknown	NO
• 33	gB	NO
• 60/65	iv host range factor	NO
• 64	IE gene, transcriptional activator	YES
• 2	unknown	NO
• 35	capsid assembly	NO
• 63	transcriptional activator	NO
• 69	protein kinase	NO

CTL summary

- In horses with the A3 MHC haplotype, the IE gene 64 of EHV-1 is presented by the MHC class I B2 allele

Pilot Vaccine Trial

- B2+ weanlings
- NYVACC-gene64 construct
- CTL & IFN γ responses



Phillips et al. 2009b

Summary of NYVACC gene 64 vaccine trial

- Vaccination induced EHV-1- specific memory cells which, upon reactivation demonstrated:
 - CTL activity
 - IFN γ synthesis

Future aims

- Identify CTL target peptides of gene 64
 - Construct MHC class I – peptide tetramers
 - Enumerate peptide specific immune responses in Thoroughbred horses
- Characterise CTL target proteins in other MHC haplotypes which are common in Thoroughbred horses
- Design novel vaccines to stimulate CTL in the whole horse population

The state of the art.....

PATHOGENESIS

PROTECTIVE IMMUNE
RESPONSES

The state of the art.....

PATHOGENESIS

PROTECTIVE IMMUNE
RESPONSES

- the virological features of EHV-1 which require control have been identified

The state of the art.....

PATHOGENESIS

PROTECTIVE IMMUNE
RESPONSES

- the virological features of EHV-1 which require control have been identified
- the adaptive immune response to EHV-1 is well characterised

The state of the art.....

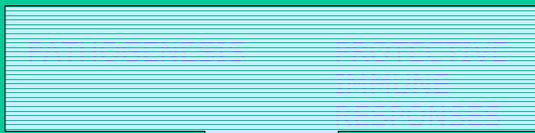
PATHOGENESIS

- the virological features of EHV-1 which require control have been identified

PROTECTIVE IMMUNE RESPONSES

- the adaptive immune response to EHV-1 is well characterised
- the contribution of specific immune responses to protection has been quantified

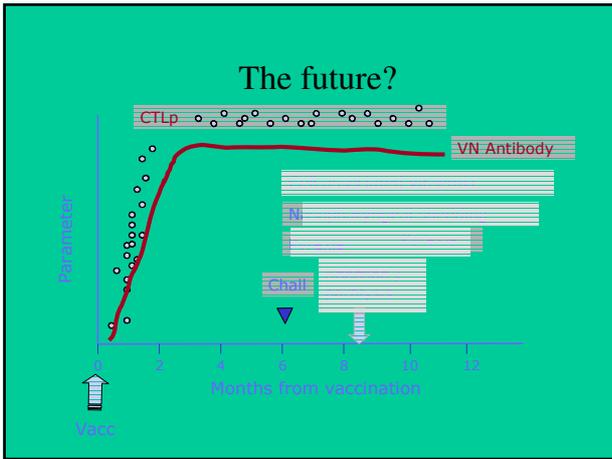
The state of the art.....



...from all these data, what are the immune responses required for protection against disease caused by EHV-1?

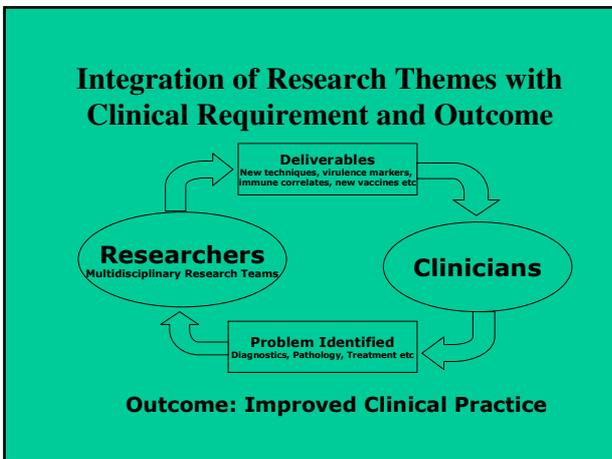
Circulating in the blood and present at the mucosal surface:

- High frequencies of CTL to lyse virus infected cells, in particular to control the cell associated viraemia
- High titres of VN antibody to neutralise both free infectious virus and the virus released after lysis of infected cells by CTL



The Important Objective:

Can we induce EHV1-specific CD8+ CTL by vaccination?



Summary

- Clues from pathogenesis and molecular basis of virulence.
- Estimate the requirements for long-term immunity.
- Apply this knowledge to rational approach for vaccine development.

Acknowledgements

Animal Health Trust

Julia Kydd, Romain Palliot, Richard Lucas, Ken Smith, Nick Davis Poynter, Jenny Mumford, James Wood



Institute for Animal Health, Compton
Shirley Ellis



Merial SAS, France & Merial Ltd, UK
Jules Minke & Jean-Christophe Audonnet



Cornell University, New York, USA
Doug Antczak, Laura Goodman,
Klaus Osterrieder



Cambridge University

Barbara Blacklaws

Horse Race Betting Levy Board
Research grant 679





Fender Telecaster Custom
1973



Borna disease: a real threat? Main features of the infection in the horse and recent research developments

N. Nowotny¹, R. Dürrwald^{2*}, J. Kolodziejek^{1,*},
S. Herzog³, M. Hilbe⁴, F. Ehrensperger⁴

¹Zoonoses and Emerging Infections Group, Clinical Virology,
Clinical Department of Diagnostic Imaging, Infectious Diseases and Clinical Pathology,
University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria;

²Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH (IDT), Rodleben, Germany;

³Institute of Virology, Justus-Liebig University, Giessen, Germany;

⁴Institute of Veterinary Pathology, Vetsuisse Faculty, University of Zurich, Switzerland
*contributed equally to this study

History of BD in animals

- The disease is known in horses since the 18th century (1766)
- First reports in sheep date back to the late 19th century
- 1909: Joest, Degen: inclusion bodies
- 1924: Experimental transmission & filtration experiments suggested a viral etiology
- 1990s: First demonstration of virus particles by EM
- 1994: Genome organization and BDV sequence determined

The name-giving city of Borna in Saxony, Germany, at the end of the 19th century, where from 1894-1896 an epidemic occurred in horses



from Dürrwald and Ludwig, 1997

Clinical symptoms

- Vary significantly; include
- Loss of appetite
- Difficulties in swallowing and chewing („pipe-smoking syndrome“)
- Alterations in behavior
- Fearfulness and unusual aggressiveness, or
- Lethargy, somnolence, depression
- Blindness
- Circling
- Neurological signs progress >
- Ataxia, paralysis, followed by death
- Mortality rate: ~ 90%



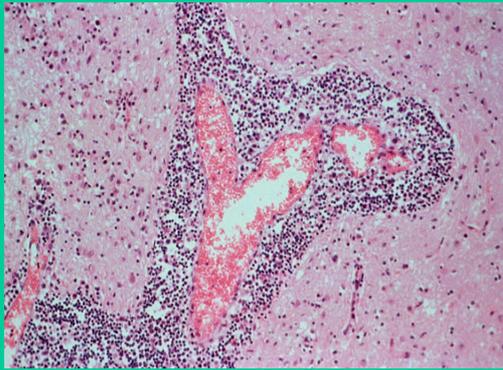
Pathogenesis

- **T-cell mediated immunopathological reaction**
 - Newborn, athymic or immunocompromised rats showed no BD and no acute inflammatory reaction following BDV infection, but BDV could be recovered
 - Adult immunocompetent rats exhibited inflammation and disease

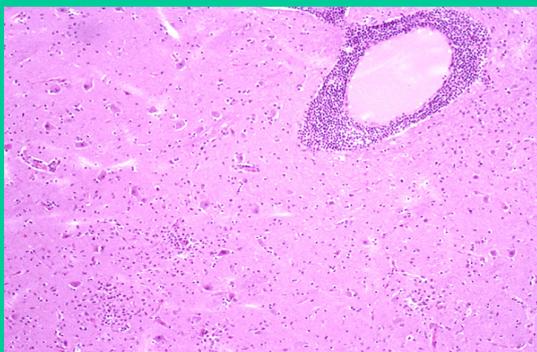
Histopathological findings

- Usually restricted to CNS (mainly in the gray matter), spinal cord, retina
- Severe non-purulent meningoencephalomyelitis with massive perivascular cuffing
- Lymphocytic infiltrations are most prominent in hippocampus, brain stem, and parts of the cerebral cortex

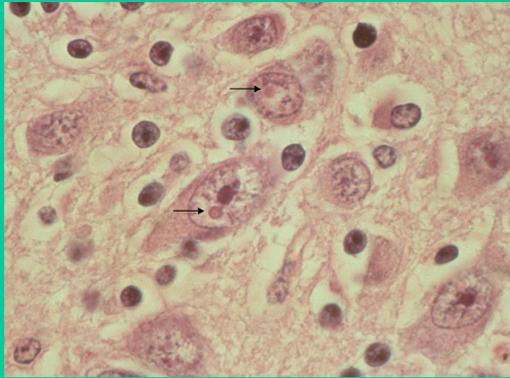
Perivascular cuff



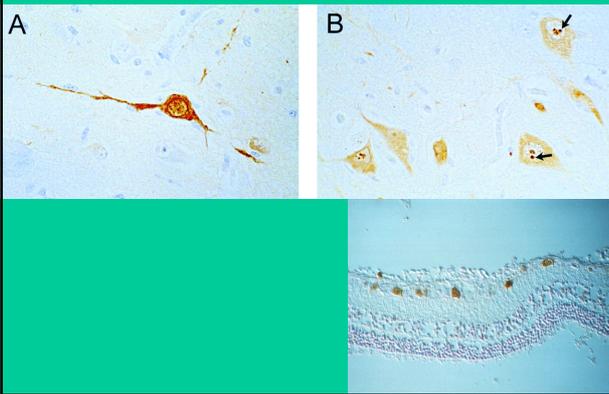
Perivascular cuffing



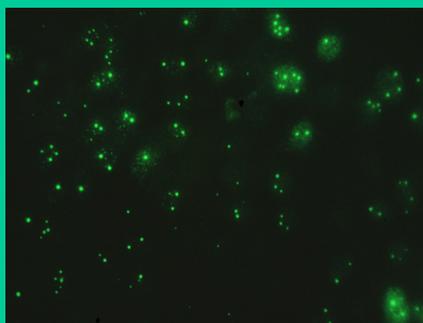
Intranuclear Joest-Degen inclusion bodies



Immunohistochemistry (Bo-18)

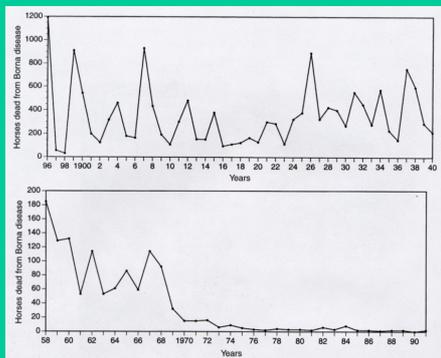


BDV serology: IFA



from S. Herzog

Epidemiology



Borna disease in horses, Saxony, Germany; Dürwald and Ludwig, 1997

Available online at www.elsevier.com/locate/journal
Microbes and Infection 8 (2006) 917–929

Microbes and Infection
www.elsevier.com/locate/journal

Review
Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations
Ralf Dürwald^a, Jolanta Kolodziejczak^b, Amnon Malachuk^c, Silylke Herzig^d, Norbert Nowozyk^{e,f,g}

R. Dürwald et al. / *Microbes and Infection* 8 (2006) 917–929

Dynamics of Borna disease in horses and sheep in the district of Leipzig, Saxony, Germany, from 1958 - 1990

Year	Horses	Sheep
58	100	200
60	900	150
62	200	100
64	400	60
66	200	80
68	900	120
70	200	20
72	400	10
74	200	10
76	200	10
78	200	10
80	900	10
82	400	10
84	200	10
86	500	10
88	200	10
90	800	10

Epidemiology (ctd)

- In certain years significantly more cases than in others
- Seasonal accumulation of cases in spring and early summer
- Natural BD is restricted to endemic areas: certain regions in Germany, Switzerland, Austria and the Principality of Liechtenstein
- Areas of endemicity remain since decades and centuries despite world-wide animal trade
- In horses, BD is a sporadic disease, and usually only one animal is affected in a stable
- Asymptomatic carriers (which could play a role in transmission) seem to be infrequent
- BDV strains are not species-specific (i.e. no horse-strains, sheep-strains etc > common reservoir more likely)

➤ **Rodent (?) reservoir**

Available online at www.sciencedirect.com
 ScienceDirect
 Microbes and Infection
 www.elsevier.com/locate/micinf

Review
 Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations
 Ralf Dirrwald^a, Jolanta Kolodziejek^b, Amaro Malanck^c, Sibylle Herzog^d, Norbert Nowotny^{a,d,*}



More cases in premises with low hygiene

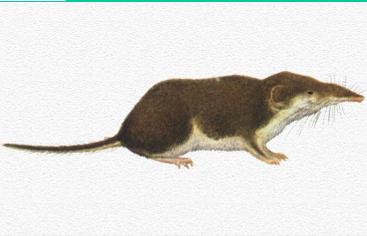
Fig. 3. Typical farm in a region with endemic classical Borna disease (cBD) in the eastern part of Germany (Thuringia, 1993), where a sheep succumbed to cBD 1 month before this photograph was taken. Note the mixing of animal species (here poultry, rabbits, and sheep) and the poor hygienic standards.

Shrews as Reservoir Hosts of Borna Disease Virus

Bicolored white-toothed shrew
Crocidura leucodon

Monika Hilbe,^{*} Romana Herrsche,^{*} Jolanta Kolodziejek,[†] Norbert Nowotny,^{†‡} Kati Zinszky,^{*} and Felix Ehrensperger^{*}

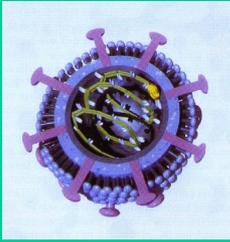
Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 12, No. 4, April 2006



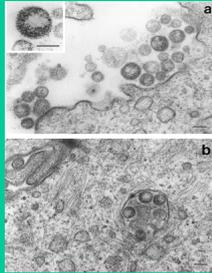
Borna disease virus (BDV)

- Enveloped
- Negative-stranded non-segmented RNA genome of approx. 8.9 kb
- Overlapping ORFs
- Replicates and transcribes its genome in the nucleus
- Uses the cellular RNA splicing machinery to regulate gene expression
- Classified as the prototype member of a newly established virus family, *Bornaviridae*, within the order *Mononegavirales*
- Highly neurotropic
- Noncytolytic

Borna disease virus morphology



Computer-generated image of BDV morphology; Bode and Ludwig, 1997



Electron micrograph; Kohno et al, 1999

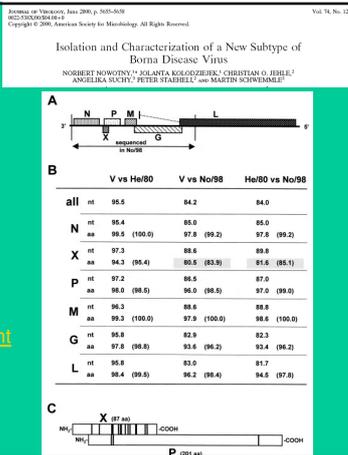
BDV has a helical nucleocapsid. The virion is enveloped and appears spherical. The diameter of the virus is 70-130 nm. The outer envelope is covered with spikes that are approx. 7nm long

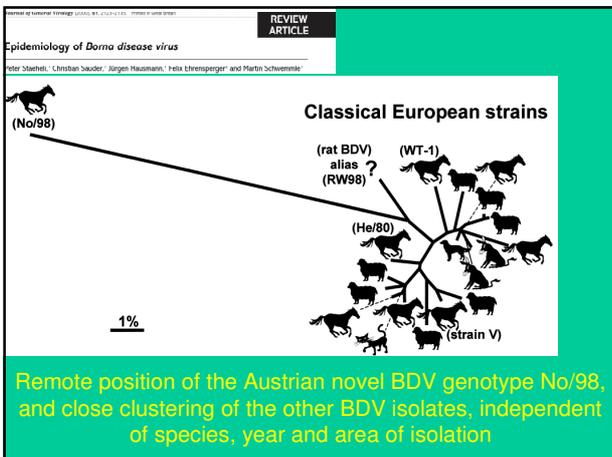
Genome organization:

Six ORFs:

- p38/40, nucleoprotein (N)
- p24, phosphoprotein (P)
- p16, matrix protein (M)
- p 56, glycoprotein (G)
- p 180, L-polymerase (L)
- p10, X protein (X)

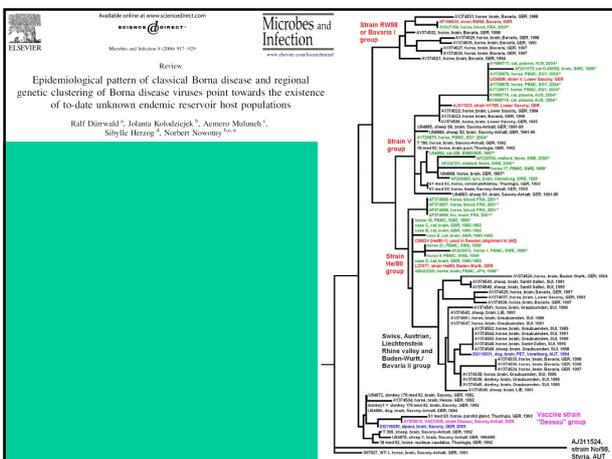
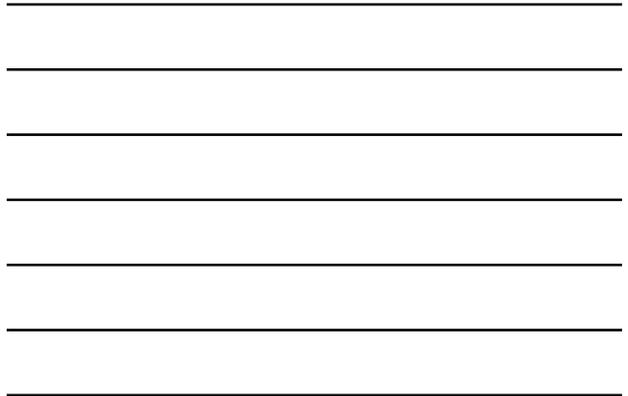
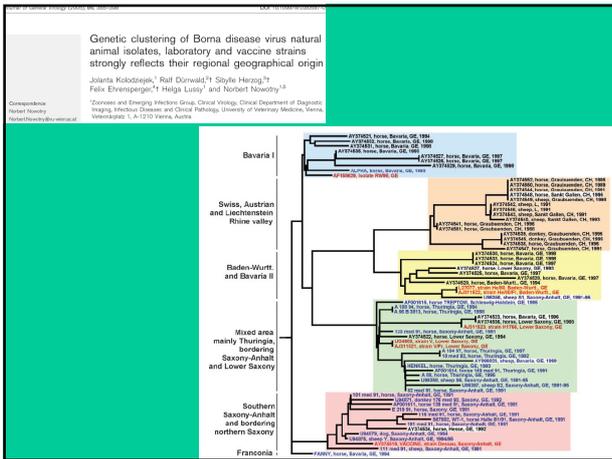
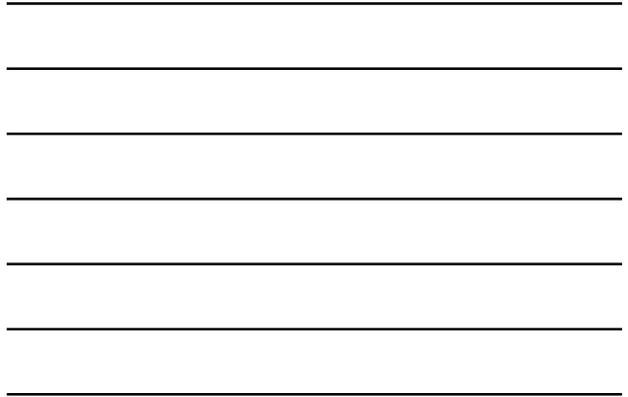
With one exception, all BDV isolates and RT-PCR amplification products show 94-100% nt identity, independent of animal species, year and area of isolation
 >unusual for an RNA virus



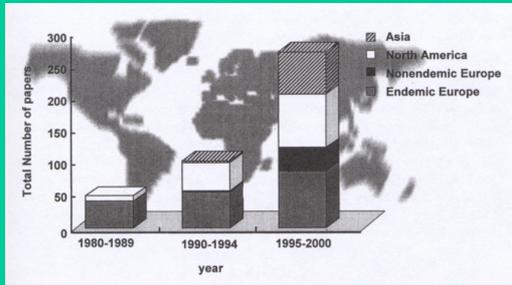


Epidemiology (ctd)

- Contrary to the observation of a restriction of classical BD to certain areas in central Europe, many papers have been published claiming identification of BDV infections in several animal species world-wide (Japan, Australia, Egypt, France, UK, Sweden, ...)

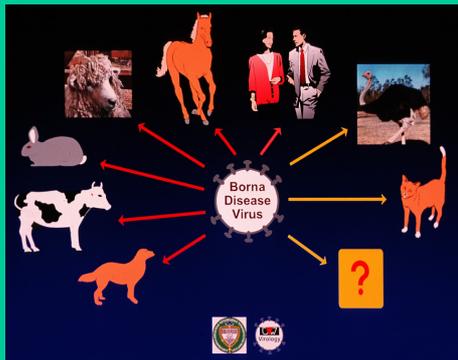


Number of publications on Borna disease virus



from Tomonaga and Carbone, 2002

Borna disease: Natural host range



Human Borna disease

- 1985: First serologic evidence (Rott et al.): BDV antibodies found in psychiatric patients in Germany and in the U.S., but not in healthy controls
- Subsequently and until today many labs identified by various serological methods BDV seroreactivity in different kinds of psychiatric disorders, and significantly less antibodies in healthy controls

Human Borna Disease (ctd)

- In many different psychiatric disorders a link to BDV has been established, e.g.
 - Depression
 - Schizophrenia
 - Chronic fatigue syndrome
 - Hippocampus sclerosis
 - Panic disorder

Human Borna Disease (ctd)

- 1995 Bode et al. detected BDV-specific nucleic acid in PBMCs of psychiatric patients using nested RT-PCR
- Many similar reports from around the world followed this publication, however also critical reports questioning the human origin of these PCR amplification products

Take home message

- **Borna disease in animals:**
remains a rare disease of solipeds and sheep and a few other animal species, which is restricted to certain endemic regions of central Europe
- **Human Borna disease:**
does most likely not exist
All human-derived BDV sequences turned out to be laboratory artefacts
due to contamination of the human samples with BDV laboratory strains, plasmids, BDV-infected cell cultures, animal BDVs etc. and subsequent amplification by nested RT-PCR;
in addition, sequences were frequently not manually corrected but the raw data were published.

Sviluppo di metodi diagnostici per la sorveglianza delle neuropatologie di origine virale degli equini

Gian Luca Autorino
Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini
Milano e Roma 13 e 15 ottobre 2006



Ambito della ricerca e linee guida

- *ricerca finalizzata art. 12 D.L.vo 502/92 – anno finanziario 2005*
- *Area tematica 8.1.d – Sanità animale: messa a punto di tecniche diagnostiche di laboratorio, ad alto valore predittivo, con particolare riguardo a quelle applicabili alla diagnosi di routine in larga scala*
- *Inizio progetto: luglio 2006 – durata: 24 mesi*

La diagnosi differenziale delle encefaliti del cavallo e la scelta degli agenti patogeni ai fini del progetto di ricerca

Famiglia	Genere	Virus
Togaviridae	Alphavirus	WEE, EEE, VEE
Flaviviridae	Flavivirus	encefalite giapp. west nile tick borne encep.

Herpesviridae	Varicellovirus	EHV 1 / EHV 4
Mononegavirales ()		
Bornaviridae		borna virus
Rhabdoviridae	Lyssavirus	virus rabbia
<i>Encefaliti parassitarie</i>		
<i>Equine protozoal myeloenceph.</i>		<i>Sarcocystis neurona</i>

Perché la diagnosi eziologica

- Sovrapposibilità di sintomi VS diversi approcci terapeutici e di management ai fini del contenimento della diffusione
- Problemi di Sanità Veterinaria
- Problemi di Sanità Pubblica

Quali matrici biologiche ai fini della diagnosi

Animali in vita:

- Diagnosi sierologica: doppio campione di sangue senza anticoagulante a distanza di 2 settimane
- Diagnosi virologica: campione di sangue con anticoagulante (sodio eparina/EDTA) – tamponi nasali *

Animali deceduti:

- Cervello e midollo allungato **

Criticità dei Metodi Diagnostici di Laboratorio Attualmente in Uso

- Reagenti poco specifici e mancanza di materiale di riferimento > problemi di sensibilità e specificità dei metodi - difficoltà di standardizzazione tra i vari laboratori
- Difficile automazione con rischi di cross-contaminazione e costi elevati
- Impossibile ricerca contemporanea per più agenti eziologici > tempi di esecuzione più lunghi

Obiettivi del progetto

- sviluppare metodi diagnostici innovativi per la ricerca simultanea e rapida di virus causa di neuropatologie degli equini e comuni all'uomo
- realizzare e validare metodi a basso rischio biologico
- istituire una rete di sorveglianza con obiettivi di Sanità Pubblica

Strumenti:

- Reagenti immunologici dotati di elevata specificità (anticorpi monoclonali e proteine ricombinanti) *
- Standard di riferimento per i vari metodi
- Real-Time PCR simultanee o multiplex +
- Tecnologia microarray per diagnosi simultanee e per la tipizzazione degli agenti virali #

Vantaggi

- Diagnosi simultanea e differenziale per infezioni diverse ma con sintomatologia comune
- Basso o nullo rischio biologico
- Miglioramento della sensibilità e specificità dei metodi
- Standardizzazione e trasferibilità dei metodi
- Automazione e riduzione dei tempi di risposta
- Abbattimento dei costi mediante, migliore gestione della diagnostica e di eventuali piani di controllo ed emergenze

OUTPUT DEL PROGRAMMA

- 4° mese: disponibilità di materiali di riferimento e individuazione delle sequenze dei primers per PCR Real Time e delle sonde per tecnologia microarray
- 6° mese: **formazione sulle infezioni virali del sistema nervoso centrale del cavallo e presentazione del progetto agli operatori del SSN ed ai professionisti del settore**
- 8° mese : proteine ricombinanti
- 12° mese: anticorpi monoclonali e sviluppo metodi molecolari

OUTPUT DEL PROGRAMMA

- 15° mese: sviluppo dei diversi metodi immunoenzimatici ed immunoistochimici
- 20° mese: costituzione di panels di sieri e campioni biologici da impiegare in circuiti interlaboratorio e realizzazione di prove interlaboratorio. Sviluppo di tecnologia microarray
- 24° mese: **realizzazione di un evento formativo per la presentazione dei prodotti della ricerca**

- **Fasi di avanzamento del programma:**Homepage dell'Istituto (<http://www.izslt.it>) consultare il sito tematico CERME (Centro di referenza malattie degli equini)
- **Flussi informativi:** impiego schede di accompagnamento campioni scaricabili dal sito tematico CERME

Partecipanti e valore aggiunto dell'aggregazione delle strutture

- Centro di Referenza Nazionale per le Malattie degli Equini
- Istituti Zooprofilattici
- Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano e Pisa
- UNIRELAB srl

Trasferibilità dei risultati e dei prodotti

- Metodi sviluppati e standardizzati > rete dei laboratori ufficiali
- Trasferimento delle conoscenze > pubblicazioni scientifiche e formazione permanente
- Tecnologie a basso costo, rapide e sensibili > attivazione di efficienti sistemi di sorveglianza

**Criticità legate alla diagnosi delle malattie
trasmissibili degli equini
Ippiatři**

- Modesto peso dato al concetto di Sanità Pubblica nel mondo dei cavalli
- Modesto senso di appartenenza ad una categoria di medici e sanitari
- Scarsa attenzione nei confronti di regole o regolamenti sanitari

**Criticità legate alla diagnosi delle malattie
trasmissibili degli equini
Veterinari ufficiali**

- Frequente approccio repressivo rispetto ai problemi connessi alla presenza di malattie diffuse
- Modesta attenzione rispetto al peso economico dell'industria equina

Risultati

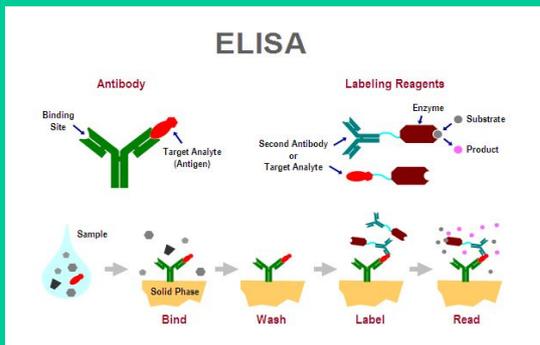
- Mancanza di rapporto fra veterinari pubblici e liberi professionisti
- Giocare a guardia e ladri
- Perdita di credibilità della categoria

Come si può recuperare il rapporto

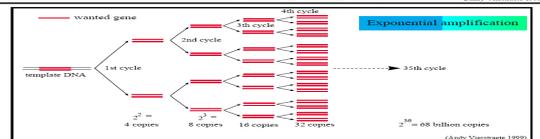
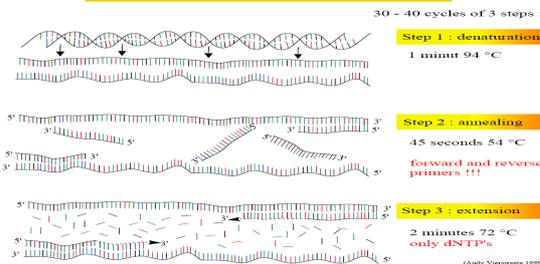
- *Problem solving*
- Favorire la comunicazione e la diffusione dell'informazione reciproca
- Formazione continua con docenti che abbiano sia competenze di sanità equina, sia di sanità pubblica
- Individuare referenti nelle ASL
- Educazione al rispetto dei regolamenti sanitari

*

Reagenti immunologici dotati di elevata specificità (anticorpi monoclonali e proteine ricombinanti)



PCR : Polymerase Chain Reaction



* **Real-Time PCR**

The diagram illustrates the mechanism of Real-Time PCR using a TaqMan probe. It shows a primer (R) binding to the 3' end of a template DNA strand. The TaqMan probe, which has a 5' end labeled with a red fluorophore (Q) and a 3' end labeled with a green fluorophore (R), is hybridized to the template. As Taq polymerase (Taq) extends the primer, it cleaves the probe, releasing the green fluorophore. This process is repeated for each cycle, leading to exponential amplification of the target DNA. The graph on the right shows the amplification curves for different samples, with the y-axis representing fluorescence intensity and the x-axis representing the number of cycles. The curves show that the target DNA is amplified more rapidly in the presence of the probe, leading to a higher fluorescence signal.

* **Tecnologia microarray**

The flowchart illustrates the process of microarray technology. It starts with DNA clones, which are amplified by PCR and purified. These clones are then printed onto a microarray using robotic printing. Simultaneously, test and reference samples are prepared by reverse transcription and labeled with fluor dyes. The target DNA is hybridized to the microarray. The resulting fluorescence is detected using two lasers (laser 1 and laser 2) for excitation, and the emission is captured by a camera. The data is then analyzed using computer analysis software.

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: eexec

STACK:

/quit
-dictionary-
-mark-

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA
(D.L.vo 30.06.1993n. 270)

CENTRO DI REFERENZA PER LE MALATTIE DEGLI EQUINI (Ce.R.M.E.)



CENTRO REFERENZA NAZIONALE
MALATTIE DEGLI EQUINI

**REPORT
CIRCUITO INTERLABORATORIO PER LA VALIDAZIONE DI TRE METODI REAL-TIME
PCR PER LA DIAGNOSI DIFFERENZIALE E SIMULTANEA DI 3 ENCEFALOMIELITI
INFETTIVE DEGLI EQUINI: HERPESVIRUS EQUINO TIPO 1 (EHV-1) , WEST NILE VIRUS
(WNV) E BORNAVIRUS (BDV).**

2008 / 2009

ISTITUTI ZOOPROFILATTICI PARTECIPANTI:17

INDICE

1. Premessa Metodologica	2
1.1 Materiali e Metodi	2
2. Il Processo di Valutazione	3
2.1 Valutazione della accuratezza intra-laboratorio e inter-laboratorio	3
2.2 Valutazione della precisione intra-laboratorio e inter-laboratorio (ripetibilità e riproducibilità)	3
2.2.1 Ripetibilità Intra-laboratorio	4
2.2.2 Riproducibilità inter-laboratorio	5
2.2.3 Interpretazione del valore di K	5
3. Risultati	6
3.1. Valutazione dell'accuratezza intralaboratorio	6
3.2. Valutazione della Precisione (Ripetibilità) intra-laboratorio	13
3.3. Valutazione generale Intra-laboratorio: Accuratezza e Ripetibilità	18
3.4. Valutazione della accuratezza inter-laboratorio	20
3.5. Valutazione della Precisione (Riproducibilità) inter-laboratorio	22
3.6. Valutazione generale Inter-laboratorio: Accuratezza e Riproducibilità	26
4. Valutazioni Finali	26

Redatto da Marcello Sala, Maria Teresa Scicluna, Demetrio Amaddeo e Gian Luca Autorino

1. PREMESSA METODOLOGICA

1.1 Materiali e Metodi

Per la prova di RT-PCR sono state distribuite ad ogni laboratorio 3 serie di 20 campioni codificati in maniera univoca.

Il panel era composto da 10 campioni negativi, 3 campioni positivi per WNDV, 3 campioni positivi per BDV e 4 campioni positivi per EHV-1.

Ai fini della valutazione il panel era costituito:

Diagnosi virus-specifica

- WNDV: 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie
- EHV-1: 16 campioni negativi e 4 positivi x 3 serie
- BDV: 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie

Diagnosi simultanea:

- ENDV+EHV-1+BDV: 10 campioni negativi e 10 campioni positivi x 3 serie

Campioni negativi. I campioni negativi sono stati ottenuti da cervello e midollo spinale di un cavallo sano, regolarmente macellato, risultato negativo ad una serie di 10 prove ripetute in Real-Time PCR virus-specifiche per i 3 virus.

Campioni positivi. I campioni positivi sono stati allestiti "inseminando" il campione di origine di tessuto nervoso negativo di cui sopra con i ceppi di riferimento dei tre virus:

- WNDV eygpt 101 (inattivato)
- EHV-1 Army 83
- BDV H1766.

I campioni del panel derivano da 3 campioni-madre positivi per ognuno dei 3 virus e un campione madre negativo, successivamente aliquotati per costituire i singoli campioni positivi e negativi costituenti le 3 serie del panel per ogni laboratorio partecipante.

Protocolli PCR. Ai laboratori partecipanti sono stati forniti seguenti materiali di riferimento:

- Primers per la RT-PCR

Le 3 RT-PCR virus specifiche sono basate sulla selezione di target molecolari altamente conservati del genoma dei 3 virus.

[gene NS1-NS2](#) (WNDV) Cersini A. et al 2007 (IX Congress Società Italiana Diagnostica di Laboratorio Veterinaria, Abst. book)

[gene gE](#) (EHV-1). A. Damiani et al. 2005 (5th National Congress of the Italian Society of Virology, Abst. book)

[gene M](#) (BDV). Cersini A. et al 2008 (X Congress Società Italiana Diagnostica di Laboratorio Veterinaria, Abst. book)

I tre metodi sono stati messi a punto nel periodo 2005-2008 nell'ambito di precedenti progetti di ricerca del CeRME e si sono dimostrati altamente sensibili e specifici.

Ad ogni laboratorio è stato chiesto di utilizzare esclusivamente i suddetti materiali per l'esecuzione delle prove e lo stesso protocollo di estrazione del menoma virale.

Le tre serie di campioni sono state analizzate in tre sedute indipendenti impiegando il metodo ed i primers consegnati ai partecipanti.

I risultati sono stati registrati su una scheda standard in base alla presenza o assenza dell'amplificato. In caso di presenza di amplificato è stato richiesto di inserire il numero di cicli medio (CT) relativo alla amplificazione virale.

2. IL PROCESSO DI VALUTAZIONE

2.1 Valutazione della accuratezza intra-laboratorio e inter-laboratorio

L'accuratezza rappresenta lo scostamento tra il risultato di una prova ed il valore di riferimento, e può anche essere espressa da sensibilità e specificità per i metodi che forniscono risultati qualitativi (ISO 5725-1).

La specificità e la sensibilità analitica possono essere valutate, nel caso di prove qualitative, effettuando una serie di prove su campioni noti (per i quali cioè si conosca lo stato di effettiva positività o negatività per l'analita ricercato).

E' stata quindi calcolata la Specificità (Sp) per ogni laboratorio e la Specificità Complessiva dei 17 laboratori rispetto al valore di riferimento negativo (true status dei campioni).

E' stata calcolata la Sensibilità (Se) virus-specifica per ogni laboratorio considerando i risultati forniti per le tre sedute indipendenti e complessiva dei 17 rispetto al valore di riferimento positivo per ciascuno dei 3 virus (true status dei campioni).

E' stata quindi calcolata l'accuratezza complessiva dei risultati forniti da ciascun laboratorio. Tale valutazione è stata condotta sia considerando separatamente i 3 virus sia considerando la diagnosi simultanea ai 3 virus.

Per la verifica dell'accuratezza della rete dei laboratori tali valutazioni sono state condotte separatamente sia per laboratorio (considerando $20 \times 3 = 60$ determinazioni), sia sulla serie di risultati forniti dai 17 partecipanti al circuito ($60 \times 17 = 1.020$ determinazioni).

Classificazione dei risultati - accuratezza

I risultati sono stati classificati soddisfacenti in caso di accuratezza pari a 100% .

2.2 Valutazione della precisione intra-laboratorio e inter-laboratorio (ripetibilità e riproducibilità)

La precisione è la concordanza dei valori ottenuti da una serie di misurazioni effettuate nelle medesime condizioni e comprende: ripetibilità e riproducibilità. La ripetibilità esprime la concordanza fra valori ottenuti da prove indipendenti condotte, nello stesso laboratorio, in un breve intervallo di tempo ed utilizzando gli stessi materiali, metodi ed apparecchiature. La riproducibilità esprime la

concordanza fra valori ottenuti da prove indipendenti utilizzando lo stesso metodo, lo stesso materiale, ma in laboratori diversi, e con apparecchiature ed operatori diversi (ISO 3534-1).

L'indice di concordanza più semplice è rappresentato dalla proporzione di repliche concordi (positive e negative) rispetto al totale delle repliche effettuate, ossia considerando una tabella 2x2:

$$C = \frac{A+D}{N}$$

Questo indicatore non tiene conto, tuttavia, delle concordanze che si verificano per puro effetto del caso. Un metodo per valutare la ripetibilità intralaboratorio o la riproducibilità interlaboratorio attraverso la valutazione della concordanza, depurata dell'effetto del caso, è il calcolo dell'indice K di Cohen.

2.2.1 Ripetibilità Intra-laboratorio

La concordanza complessiva rispetto ai campioni di riferimento negativi e positivi, a livello intra-laboratorio (60 determinazioni) è stata valutata mediante calcolo dell'Indice K, ossia operando un rapporto tra i risultati concordanti non dovuti al caso ed il numero massimo di risultati non dovuti al caso (K) (Fleiss 1981; Altman 1991) attraverso le seguenti formule:

$$K = \frac{\text{n}^\circ \text{ accordi osservati} - \text{n}^\circ \text{ accordi dovuti al caso}}{\text{n}^\circ \text{ totale campioni} - \text{n}^\circ \text{ accordi dovuti al caso}}$$

Ovvero, considerando una classica tabella 2x2:

$$K_1 = \frac{(a+d) - \{[(a+b)(a+c) / N] + [(c+d)(b+d) / N]\}}{(a+b+c+d) - \{[(a+b)(a+c) / N] + [(c+d)(b+d) / N]\}}$$

Per ciascun laboratorio (60 determinazioni) sono quindi state calcolate 4 statistiche K di Cohen.

Diagnosi virus-specifica

- K per WNDV (51 negativi – 9 positivi)
- K per EHV-1 (48 negativi – 12 positivi)
- K per BDV (51 negativi – 9 positivi)

Diagnosi simultanea

- K per WNDV+EHV-1+BDV (30 negativi – 30 positivi)

K può assumere un valore massimo pari a **1** in caso di concordanza completa, a **0** in caso di concordanza equivalente a quella attesa per effetto del caso, e può assumere un **valore negativo** in caso di concordanza inferiore rispetto a quella che si realizzerebbe per casualmente.

La valutazione del grado di accordo attraverso il calcolo del valore K può essere esteso anche a situazioni in cui sono presenti più operatori e/o più categorie di risultato.

In questo caso sono stati calcolati, a livello intra-laboratorio, gli accordi casuali attesi per ciascuna categoria di risultato (Negativo, Positivo), separatamente per ciascun virus e complessivamente per la diagnosi simultanea dei tre virus.

La somma degli accordi attesi costituisce il numero massimo complessivo di accordi attesi per l'effetto del caso (P_e).

Sottraendo alla percentuale di accordi complessivamente osservati (P_0) per i tre virus separatamente e simultaneamente, la percentuale di accordi dovuti al caso (P_e), si ottiene la percentuale di accordi non dovuti al caso ($P_0 - P_e$).

Considerando che il massimo livello di accordo possibile è pari a 1, sottraendo a 1 la percentuale di accordi dovuti al caso (P_e), si ottiene la proporzione massima possibile di accordi non dovuti al caso ($1 - P_e$), ossia il denominatore delle formula di K.

Quindi per il calcolo di K è stata applicata la seguente formula:

$$K = \frac{P_0 - P_e}{1 - P_e}$$

Classificazione dei risultati - ripetibilità

I risultati sono stati classificati soddisfacenti per valori di K di Cohen > 0,8 .

2.2.2 Riproducibilità inter-laboratorio

La riproducibilità inter-laboratorio è stata ottenuta mediante calcolo del K MULTIPLO (Fleiss, 1981): in questo caso è stato calcolato il grado di concordanza complessiva ottenuta dalla rete dei laboratori rispetto ai risultati attesi. Anche in questo caso, i calcoli sono stati effettuati separatamente per ciascun virus e complessivamente per la diagnosi simultanea dei tre virus.

A tal fine è stata adottata la seguente formula:

$$K_{m1} / K_{m2} = \frac{\sum (P_0 - P_e)_{ii}}{\sum (1 - P_e)_{ii}}$$

dove al numeratore ed al denominatore vengono poste, rispettivamente, la somma di ($P_0 - P_e$) e la somma di ($1 - P_e$) dei 17 laboratori, ottenute al calcolo della ripetibilità intra-laboratorio.

Classificazione dei risultati - riproducibilità

I risultati sono stati classificati soddisfacenti per valori di K di Cohen > 0,8 .

2.2.3 Interpretazione del valore di K

In bibliografia sono riportati diversi criteri di valutazione del valore di K ottenuto dalle prove di laboratorio; qui di seguito viene proposta la tabella di valutazione di Landis e Kock (1977):

Valore di Kappa	Grado di accordo
<0	Poor (No better than chance)
0,0-0,2	Slight
0,21-0,4	Fair
0,41-0,6	Moderate
0,61-0,8	Substantial
0,8-1	Almost perfect

Nota: per il dettaglio relativo al calcolo di K si rimanda a Douglas G. Altman "Practical statistics for medical research"; prima ed., Chapman and Hall, London, 1991 – pag. 403-409 oppure Fleiss, J. L. (2003). Statistical methods for rates and proportions. 3rd ed. New York: John Wiley, 598-626.

3. RISULTATI

3.1 Valutazione della accuratezza intra-laboratorio

I risultati della prova di valutazione della accuratezza intralaboratorio sono riportati di seguito per i 17 Laboratori. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

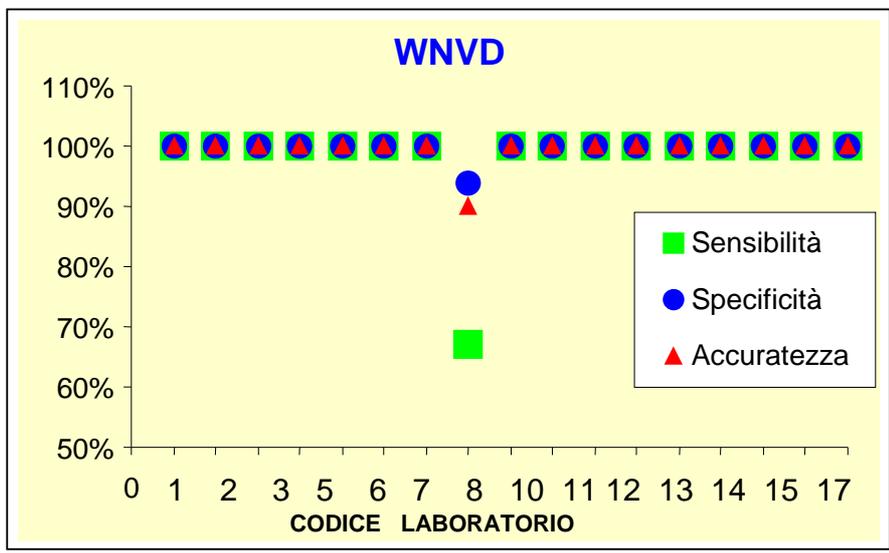
3.1.1. WNDV

Nella tabella 1 e nel grafico 1 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per WNDV

Tabella 1: WNVD Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

Codice Laboratorio	Sensibilità	Specificità	Accuratezza
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	100%	100%	100%
5	100%	100%	100%
6	100%	100%	100%
7	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%
10	0,67%	0,94%	0,90%
11	100%	100%	100%
12	100%	100%	100%
13	100%	100%	100%
14	100%	100%	100%
15	100%	100%	100%
17	100%	100%	100%
18	100%	100%	100%
19	100%	100%	100%
20	100%	100%	100%

Figura 1: WNVD Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



16 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100%

Il Laboratorio 10 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 6 campioni di riferimento (3 positivi e 3 negativi): in particolare il laboratorio ha fornito 3 risultati falsamente positivi e 3 risultati falsamente negativi.

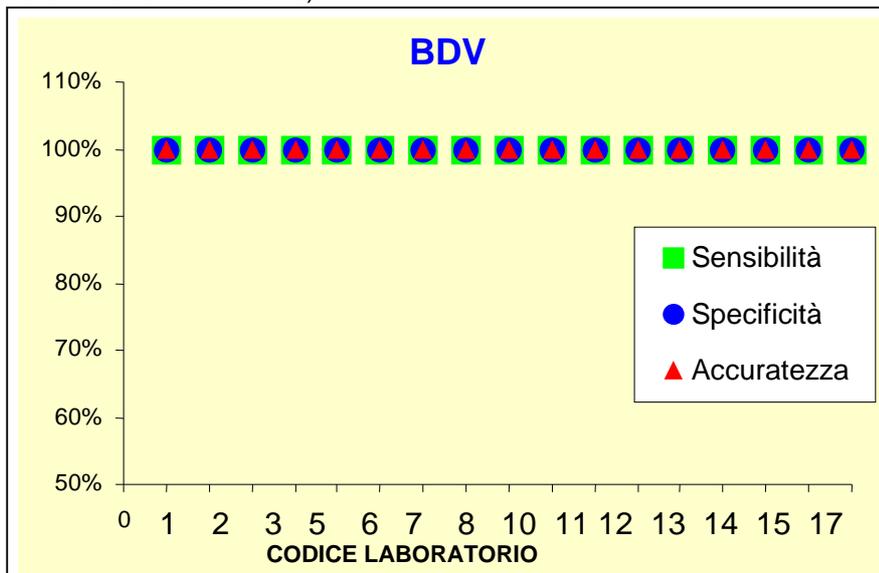
3.1.2. BDV

Nella tabella 2 e nel grafico 2 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per BDV. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 2: BDV Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

Codice Laboratorio	Sensibilità	Specificità	Accuratezza
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	100%	100%	100%
5	100%	100%	100%
6	100%	100%	100%
7	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%
10	100%	100%	100%
11	100%	100%	100%
12	100%	100%	100%
13	100%	100%	100%
14	100%	100%	100%
15	100%	100%	100%
17	100%	100%	100%
18	100%	100%	100%
19	100%	100%	100%
20	100%	100%	100%

Figura 2: BDV Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



17 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100%

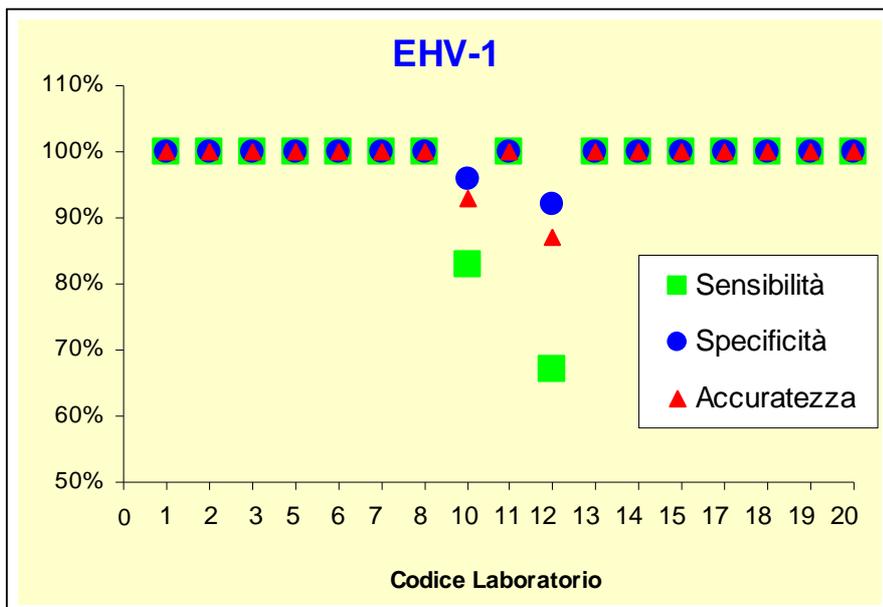
3.1.3. EHVI-1

Nella tabella 3 e nel grafico 3 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per EHV-1. Per questa diagnosi il panel era costituito da 16 campioni negativi e 4 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 3: EHV-1 Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

Codice Laboratorio	Sensibilità	Specificità	Accuratezza
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	100%	100%	100%
5	100%	100%	100%
6	100%	100%	100%
7	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%
10	0,83%	0,96%	0,93%
11	100%	100%	100%
12	0,67%	0,92%	0,87%
13	100%	100%	100%
14	100%	100%	100%
15	100%	100%	100%
17	100%	100%	100%
18	100%	100%	100%
19	100%	100%	100%
20	100%	100%	100%

Tabella 3: EHV-1 Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



15 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100%

Il Laboratorio 10 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 4 campioni di riferimento (2 positivi e 2 negativi): in particolare il laboratorio ha fornito 2 risultati falsamente positivi e 2 risultati falsamente negativi.

Il Laboratorio 12 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 8 campioni di riferimento (4 positivi e 4 negativi): in particolare il laboratorio ha fornito 4 risultati falsamente positivi e 4 risultati falsamente negativi.

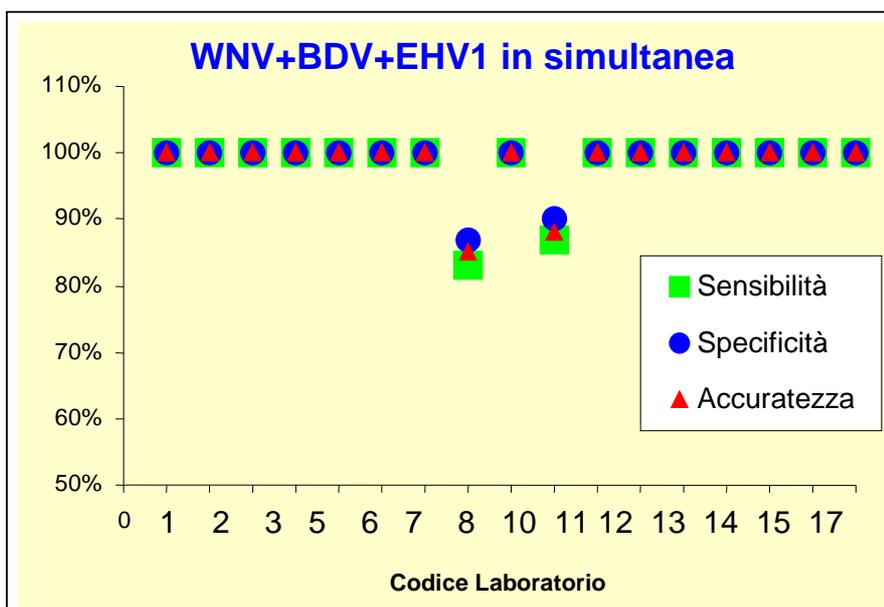
3.1.4. DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Nella tabella 4 e nel grafico 4 sono riportati i valori di accuratezza dei 17 laboratori partecipanti considerando simultaneamente (in parallelo) i risultati forniti per WNDV + EHVI-1 + BDV nelle 3 sedute indipendenti. Per questa diagnosi il panel era costituito da 10 campioni negativi e 10 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 4: Diagnosi simultanea WNDV + EHVI-1 + BDV : Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)

Codice Laboratorio	Sensibilità	Specificità	Accuratezza
1	100%	100%	100%
2	100%	100%	100%
3	100%	100%	100%
5	100%	100%	100%
6	100%	100%	100%
7	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%
10	0,83%	0,87%	0,85%
11	100%	100%	100%
12	0,87%	0,90%	0,88%
13	100%	100%	100%
14	100%	100%	100%
15	100%	100%	100%
17	100%	100%	100%
18	100%	100%	100%
19	100%	100%	100%
20	100%	100%	100%

Figura 4: Diagnosi simultanea WNDV + EHVI-1 + BDV : Accuratezza intra-laboratorio. Risultati della valutazione dei laboratori (60 determinazioni/laboratorio)



15 laboratori su 17 hanno ottenuto una accuratezza pari a 100% per la diagnosi in simultanea WNDV + EHVI-1 + BDV

Il Laboratorio 10 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 6 campioni di riferimento (3 positivi e 3 negativi) per WNVD e di 4 campioni di riferimento (2 positivi e 2 negativi) per EHV-1. il laboratorio ha complessivamente fornito 5 risultati falsamente positivi e 5 risultati falsamente negativi.

Il Laboratorio 12 ha ottenuto una accuratezza non soddisfacente a causa della misclassificazione di 8 campioni di riferimento (4 positivi e 4 negativi) per EHV-1: in particolare il laboratorio ha fornito 4 risultati falsamente positivi e 4 risultati falsamente negativi.

Si segnala tuttavia che i 2 laboratori con accuratezza non soddisfacente non hanno fatto rilevare l'esistenza di aspecificità crociate tra i 3 virus oggetto di diagnosi.

3.2 Valutazione della Precisione (Ripetibilità) intra-laboratorio

I risultati della valutazione del grado di accordo (K di Cohen) rispetto al valore di riferimento basato sul criterio di classificazione di Landis e Kock sono riportati nelle tabelle e figure seguenti.

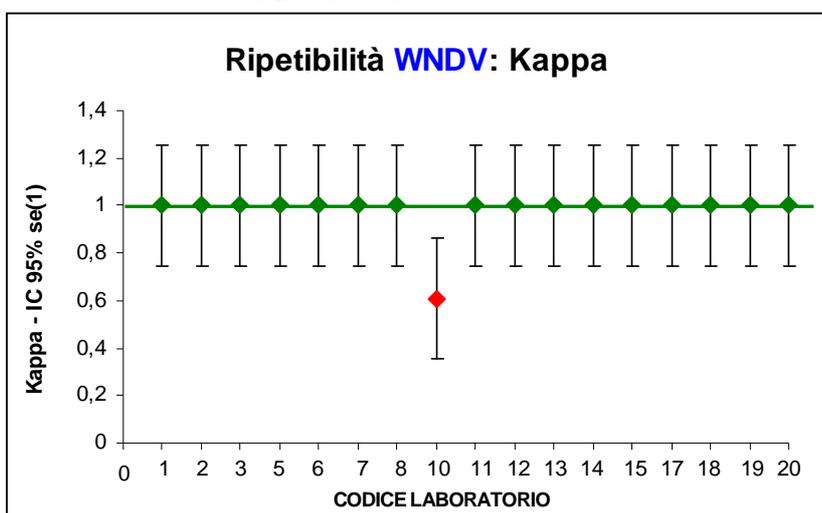
3.2.1. WNDV

Nella tabella 5 e nel grafico 5 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per WNDV. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17 campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 5: WNDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

Codice Laboratorio	Kappa	IC 95% - limits - Se(1)		
		lower	upper	
1	1	0,747	1,253	
2	1	0,747	1,253	
3	1	0,747	1,253	
5	1	0,747	1,253	
6	1	0,747	1,253	
7	1	0,747	1,253	
8	1	0,747	1,253	
10	0,61	0,36	0,86	ripetibilità non soddisfacente
11	1	0,747	1,253	
12	1	0,747	1,253	
13	1	0,747	1,253	
14	1	0,747	1,253	
15	1	0,747	1,253	
17	1	0,747	1,253	
18	1	0,747	1,253	
19	1	0,747	1,253	
20	1	0,747	1,253	

Figura 5: WNDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock



16 laboratori su 17 hanno mostrato una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi di WNDV, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

Il Laboratorio 10 ha fornito un esito NON SODDISFACENTE alla valutazione della precisione intralaboratorio, mostrando una ripetibilità scarsa dei risultati ottenuti nelle 3 sedute indipendenti sugli stessi campioni.

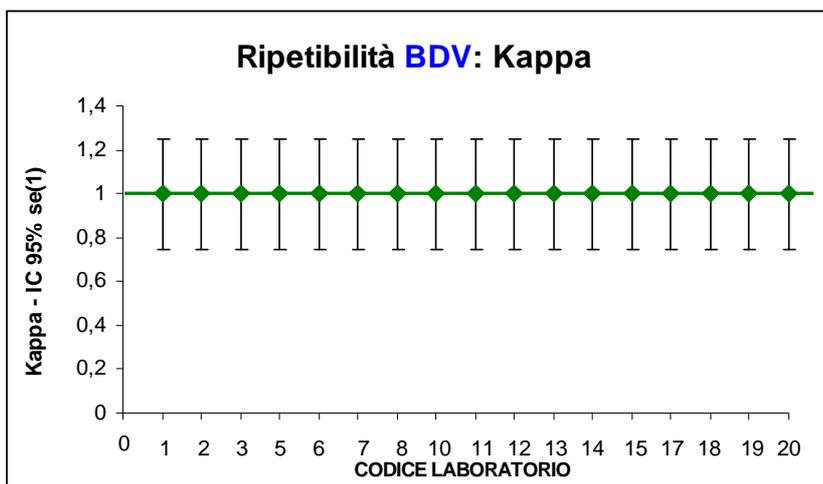
3.2.2. BDV

Nella tabella 6 e nel grafico 6 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per BDV. Per questa diagnosi il panel era costituito da 17campioni negativi e 3 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 6: BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

Codice Laboratorio	Kappa	IC 95% - limits - Se(1)	
		lower	upper
1	1	0,747	1,253
2	1	0,747	1,253
3	1	0,747	1,253
5	1	0,747	1,253
6	1	0,747	1,253
7	1	0,747	1,253
8	1	0,747	1,253
10	1	0,747	1,253
11	1	0,747	1,253
12	1	0,747	1,253
13	1	0,747	1,253
14	1	0,747	1,253
15	1	0,747	1,253
17	1	0,747	1,253
18	1	0,747	1,253
19	1	0,747	1,253
20	1	0,747	1,253

Figura 6: BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)



17 laboratori su 17 hanno ottenuto una ripetibilità **SODDISFACENTE** dei risultati forniti per la diagnosi di BDV, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

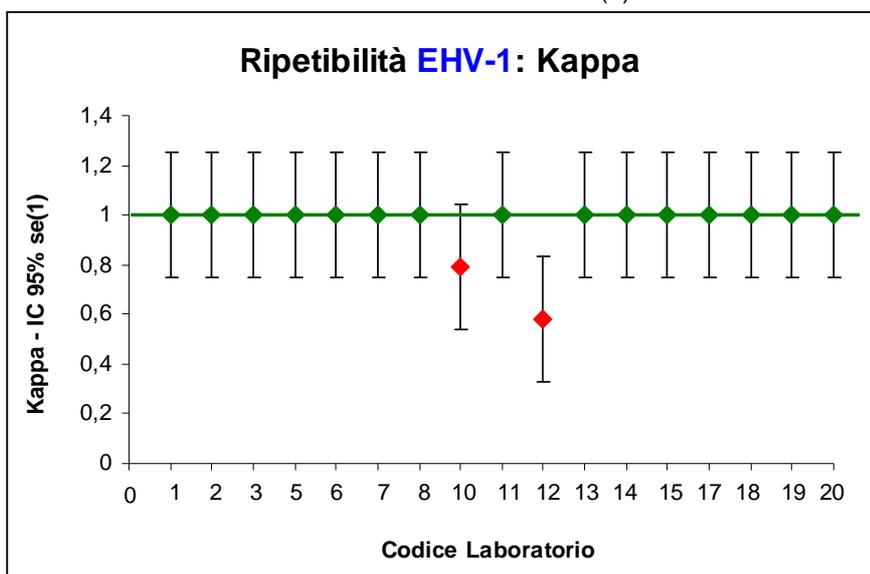
3.2.3. EHV-1

Nella tabella 7 e nel grafico 7 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti in base ai risultati forniti per EHV-1. Per questa diagnosi il panel era costituito da 16 campioni negativi e 4 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 7: EHV-1: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

Codice Laboratorio	Kappa	IC 95% - limits - Se(1)		
		lower	upper	
1	1	0,747	1,253	
2	1	0,747	1,253	
3	1	0,747	1,253	
5	1	0,747	1,253	
6	1	0,747	1,253	
7	1	0,747	1,253	
8	1	0,747	1,253	
10	0,79	0,54	1,05	ripetibilità non soddisfacente
11	1	0,747	1,253	
12	0,58	0,33	0,84	ripetibilità non soddisfacente
13	1	0,747	1,253	
14	1	0,747	1,253	
15	1	0,747	1,253	
17	1	0,747	1,253	
18	1	0,747	1,253	
19	1	0,747	1,253	
20	1	0,747	1,253	

Figura 7: EHV-1: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)



15 laboratori su 17 hanno mostrato una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi di EHV-1, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

Il Laboratorio 10 ed il laboratorio 12 hanno fornito un esito NON SODDISFACENTE alla valutazione della precisione intralaboratorio, mostrando una ripetibilità scarsa dei risultati ottenuti nelle 3 sedute indipendenti sugli stessi campioni.

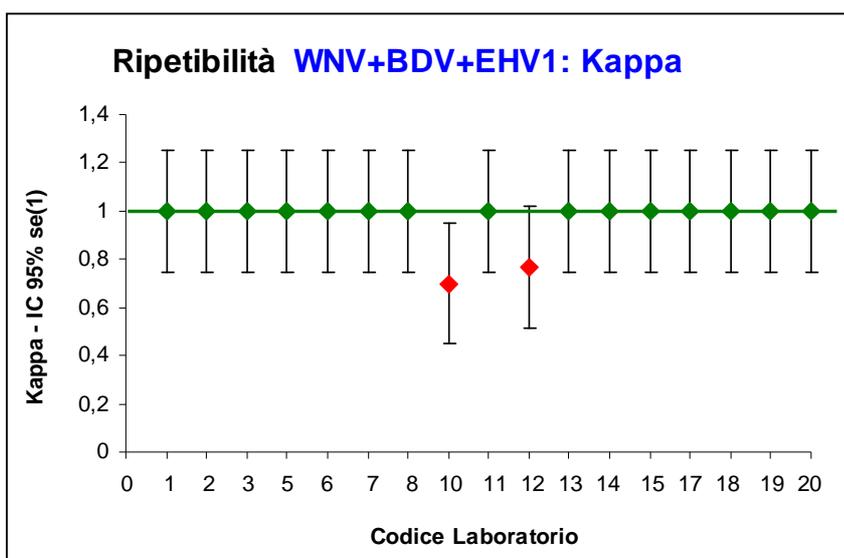
3.2.4. DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Nella tabella 8 e nella figura 8 sono riportati i valori di K di Cohen dei 17 laboratori partecipanti considerando simultaneamente (in parallelo) i risultati forniti per WNDV + EHVI-1 + BDV nelle 3 sedute indipendenti. Per questa diagnosi il panel era costituito da 10 campioni negativi e 10 positivi x 3 serie (60 DETERMINAZIONI).

Tabella 8: Diagnosi simultanea (in parallelo) WNDV + EHVI-1 + BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)

Codice Laboratorio	Kappa	IC 95% - limits - Se (1)		
		lower	upper	
1	1	0,747	1,253	
2	1	0,747	1,253	
3	1	0,747	1,253	
5	1	0,747	1,253	
6	1	0,747	1,253	
7	1	0,747	1,253	
8	1	0,747	1,253	
10	0,70	0,45	0,95	ripetibilità non soddisfacente
11	1	0,747	1,253	
12	0,77	0,51	1,02	ripetibilità non soddisfacente
13	1	0,747	1,253	
14	1	0,747	1,253	
15	1	0,747	1,253	
17	1	0,747	1,253	
18	1	0,747	1,253	
19	1	0,747	1,253	
20	1	0,747	1,253	

Figura 8: Diagnosi simultanea (in parallelo) WNDV + EHVI-1 + BDV: valutazione del grado di accordo (K) rispetto ai valori di riferimento per ogni laboratorio secondo il criterio di di Landis e Kock – IC 95% Se (1)



15 laboratori su 17 hanno mostrato una ripetibilità SODDISFACENTE dei risultati forniti per la diagnosi simultanea (in parallelo) WNDV + EHVI-1 + BDV, mostrando un livello di accordo, depurato dall'effetto del caso, perfetto rispetto ai risultati attesi

Il Laboratorio 10 ed il laboratorio 12 hanno fornito un esito NON SODDISFACENTE alla valutazione della ripetibilità intralaboratorio, mostrando un grado di accordo rispetto ai risultati attesi inferiore ai parametri richiesti.

3.3 Valutazione generale Intra-laboratorio: Accuratezza e Ripetibilità

Nella tabella 9 sono riportati i risultati complessivi della valutazione intra-laboratorio: accuratezza e ripetibilità.

Tabella 9: Diagnosi singola e simultanea (in parallelo) per WNDV EHVI-1 BDV: riassunto dei giudizi su accuratezza e ripetibilità (precisione intralaboratorio) per i 17 laboratori partecipanti

Codice laboratorio	WNDV		BDV		EHV1		WNDV+BDV+EHV-1 simultanea	
	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza
1*	+	+	+	+	+	+	+	+
2*	+	+	+	+	+	+	+	+
3*	+	+	+	+	+	+	+	+
5*	+	+	+	+	+	+	+	+
6*	+	+	+	+	+	+	+	+
7*	+	+	+	+	+	+	+	+
8*	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	+	+	-	-	-	-
11*	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	-	-	-	-
13*	+	+	+	+	+	+	+	+
14*	+	+	+	+	+	+	+	+
15*	+	+	+	+	+	+	+	+
17*	+	+	+	+	+	+	+	+
18*	+	+	+	+	+	+	+	+
19*	+	+	+	+	+	+	+	+
20*	+	+	+	+	+	+	+	+

15 laboratori su 17 hanno mostrato **risultati soddisfacenti** alla valutazione dell'accuratezza e della precisione intra-laboratorio, in virtù di una sensibilità ed una specificità pari al 100%, ed hanno mostrato una elevata ripetibilità dei risultati, sia per le singole diagnosi sia per la diagnosi simultanea ai 3 virus.

L10, ha fornito risultati non soddisfacenti alla prova di accuratezza per la singola diagnosi di WNDV e EHV-1 e conseguentemente anche alla diagnosi simultanea (in parallelo) per i 3 virus, avendo evidenziato problemi di sensibilità non trascurabili ed alcune classificazioni errate di campioni negativi come positivi. Per questo laboratorio si raccomanda di adottare tutte le azioni ed i controlli necessari ad evitare le eventuali cross-contaminazioni, che possono aver determinato l'esito non soddisfacente complessivo alla valutazione intra-laboratorio. . In particolar, i risultati forniti dal laboratorio lasciano ipotizzare che siano occorsi errori grossolani nella esecuzione delle prove.

L12 ha fornito risultati non soddisfacenti alla prova di accuratezza e ripetibilità per la diagnosi di EHV-1 avendo mostrato problemi di specificità e sensibilità, particolarmente inattesi in RT-PCR, legati alla

errata classificazione di campioni positivi come negativi. Questi risultati hanno determinato un esito non soddisfacente anche alla prova di ripetibilità alla diagnosi simultanea per i 3 virus. La valutazione intra-laboratorio complessiva è quindi non soddisfacente. Anche in questo caso, come per il L10 la misclassificazione di campioni di riferimento negativi e positivi per BDV potrebbe essere legata ad errori grossolani nell'esecuzione delle prove.

3.4 Valutazione della accuratezza inter-laboratorio

Nonostante il risultato non soddisfacente fornito da alcuni laboratori alla valutazione intralaboratorio, la valutazione di accuratezza della rete dei laboratori e di riproducibilità (precisione inter-laboratorio) risulta soddisfacente.

Le tabelle 10-13 riportano nel dettaglio le concordanze assolute osservate tra i valori di riferimento ed i risultati osservati nell'insieme dei 17 laboratori (1.020 determinazioni), rispettivamente per categorie per la singola diagnosi e per la diagnosi simultanea (in parallelo) dei 3 virus.

3.4.1. WNDV

Tabella 10. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi di **WNDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

		Valore atteso (riferimento)		totale righe
		pos+	neg	
esiti ottenuti	pos+	150	3	153
	neg	3	864	867
Totale colonne		153	867	1020

Se = 98,4% (150/153)
Sp = 99,65% (864/867)
A = 99,4% (1014/1020)

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi di WNDV è SODDISFACENTE. Sensibilità e Specificità non raggiungono il 100% a causa dei problemi di accuratezza mostrati dal Laboratorio 10.

3.4.2. BDV

Tabella 11. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi di **BDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

		Valore atteso (riferimento)		totale righe
		pos+	neg	
esiti ottenuti	pos+	153	0	153
	neg	0	867	867
Totale colonne		153	867	1020

Se = 100% (150/150)
Sp = 100% (867/867)
A = 100% (1020/1020)

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi di BDV è SODDISFACENTE. Sensibilità e Specificità raggiungono il 100%.

3.4.3. EHV-1

Tabella 12. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi di **EHV-1** (17 laboratori, 1.020determinazioni).

		Valore atteso (riferimento)		totale righe
		pos+	neg	
esiti ottenuti	pos+	198	6	204
	neg	6	810	816
Totale colonne		204	816	1020

Se = 97,06% (198/204) Sp = 99,26% (810/816) A = 98,82% (1008/1020)

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi di EHV-1 è SODDISFACENTE. Tuttavia i problemi di Sensibilità complessiva (97,06%) sono particolarmente inattesi in RT-PCR.

Si rileva tuttavia che il risultato complessivo è fortemente influenzato dalla scarsa accuratezza dimostrata da 2 laboratori (L10 e L12) nei quali sono presumibilmente intercorsi errori grossolani nella esecuzione delle prove.

3.4.4. DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Tabella 13. Sensibilità (Se), Specificità (Sp) ed Accuratezza (A) per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** (17 laboratori, 1.020determinazioni).

		Valore atteso (riferimento)		totale righe
		pos+	neg	
esiti ottenuti	pos+	501	9	510
	neg	9	501	510
Totale colonne		510	510	1020

Se = 98,24% (501/510) Sp = 98,24% (501/510) A = 98,24% (1002/1020)

L'accuratezza generale mostrata dai 17 Laboratori partecipanti che hanno applicato la metodica RT-PCR per la diagnosi simultanea di **WNDV + EHVI-1 + BDV** è SODDISFACENTE.

Si ribadisce tuttavia che il mancato raggiungimento di una accuratezza pari al 100% è fortemente influenzato dalla scarsa accuratezza dimostrata da 2 laboratori (L10 e L12") nei quali sono presumibilmente intercorsi errori grossolani nella esecuzione delle prove.

3.5 Valutazione della Precisione (Riproducibilità) inter-laboratorio

Di seguito viene riportato il calcolo dell'indice di concordanza depurato dall'effetto del caso (Kappa di cohen - Kappa multiplo) osservato nell'insieme dei 17 laboratori (1.020 determinazioni), rispettivamente per categorie per la singola diagnosi e per la diagnosi simultanea (in parallelo) dei 3 virus.

3.5.1. WNDV

Tabella 14. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi di **WNDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	864	(867*867)/1020= 736,95
accordi pos+	150	(153*153)/1020= 22,95
totale accordi	1014	736,95+22,95= 759,9

[^] cfr. tabella 10

Tabella 15. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi di **WNDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,235}{4,335} = \mathbf{0,97}$$

Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,745	0,255	0,255
2	1	0,745	0,255	0,255
3	1	0,745	0,255	0,255
5	1	0,745	0,255	0,255
6	1	0,745	0,255	0,255
7	1	0,745	0,255	0,255
8	1	0,745	0,255	0,255
10	0,9	0,745	0,155	0,255
11	1	0,745	0,255	0,255
12	1	0,745	0,255	0,255
13	1	0,745	0,255	0,255
14	1	0,745	0,255	0,255
15	1	0,745	0,255	0,255
17	1	0,745	0,255	0,255
18	1	0,745	0,255	0,255
19	1	0,745	0,255	0,255
20	1	0,745	0,255	0,255

somma	4,235	4,335
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi di WNDV nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito valori dell'indice di concordanza ottimi. La riproducibilità dei risultati è soddisfacente, nonostante la scarsa ripetibilità dei risultati forniti dal Laboratorio 10.

3.5.2. BDV

Tabella 15. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi di **BDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	867	(867*867)/1020= 736,95
accordi pos+	153	(153*153)/1020= 22,95
totale accordi	1020	736,95+22,95= 759,9

[^] cfr. tabella 11

Tabella 15. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi di **BDV** (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,335}{4,335} = 1$$

Codice Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,745	0,255	0,255
2	1	0,745	0,255	0,255
3	1	0,745	0,255	0,255
5	1	0,745	0,255	0,255
6	1	0,745	0,255	0,255
7	1	0,745	0,255	0,255
8	1	0,745	0,255	0,255
10	1	0,745	0,255	0,255
11	1	0,745	0,255	0,255
12	1	0,745	0,255	0,255
13	1	0,745	0,255	0,255
14	1	0,745	0,255	0,255
15	1	0,745	0,255	0,255
17	1	0,745	0,255	0,255
18	1	0,745	0,255	0,255
19	1	0,745	0,255	0,255
20	1	0,745	0,255	0,255

somma	4,335	4,335
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi di BDV nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito un valore dell'indice di concordanza massimo.

3.5.3. EHV-1

Tabella 16. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi di **EHV-1** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	810	(816*816)/1020=652,8
accordi pos+	198	(153*153)/1020=40,8
totale accordi	1020	652,8+40,8=693,6

[^] cfr. tabella 12

Tabella 16. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi di **EHV-1** (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,335}{4,335} = 0,96$$

Codice Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,745	0,255	0,255
2	1	0,745	0,255	0,255
3	1	0,745	0,255	0,255
5	1	0,745	0,255	0,255
6	1	0,745	0,255	0,255
7	1	0,745	0,255	0,255
8	1	0,745	0,255	0,255
10	0,933	0,680	0,253	0,320
11	1	0,745	0,255	0,255
12	0,867	0,680	0,187	0,320
13	1	0,745	0,255	0,255
14	1	0,745	0,255	0,255
15	1	0,745	0,255	0,255
17	1	0,745	0,255	0,255
18	1	0,745	0,255	0,255
19	1	0,745	0,255	0,255
20	1	0,745	0,255	0,255

somma	4,265	4,465
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi di EHV-1 nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito valori dell'indice di concordanza SODDISFACENTI, nonostante la scarsa ripetibilità dei risultati forniti dai Laboratori 10 e 12.

3.5.4. DIAGNOSI SIMULTANEA WNDV + EHVI-1 + BDV

Tabella 17. Accordi osservati e calcolo degli accordi casuali per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** (17 laboratori, 1.020 determinazioni).

	Accordi osservati [^]	Accordi casuali [^]
accordi neg-	501	(510*510/1020=255)
accordi pos+	501	(510*510/1020=255)
totale accordi	1002	255+255=510

[^] cfr. tabella 13

Tabella 17. Parametri per il calcolo di K multiplo (K_m) per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** (17 laboratori, 1.020 determinazioni). P_o = % di concordanze osservate - P_e = % di concordanze attese

$$K_m = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e} = \frac{4,335}{4,335} = 0,96$$

Codice Laboratorio	Po	Pe	Po-Pe	1-Pe
1	1	0,5	0,5	0,5
2	1	0,5	0,5	0,5
3	1	0,5	0,5	0,5
5	1	0,5	0,5	0,5
6	1	0,5	0,5	0,5
7	1	0,5	0,5	0,5
8	1	0,5	0,5	0,5
10	0,833	0,500	0,333	0,500
11	1	0,5	0,5	0,5
12	0,867	0,500	0,367	0,500
13	1	0,5	0,5	0,5
14	1	0,5	0,5	0,5
15	1	0,5	0,5	0,5
17	1	0,5	0,5	0,5
18	1	0,5	0,5	0,5
19	1	0,5	0,5	0,5
20	1	0,5	0,5	0,5

somma	8,200	8,500
--------------	--------------	--------------

La valutazione della Riproducibilità (precisione interlaboratorio) per la diagnosi simultanea (in parallelo) di **WNDV-BDV-EHV-1** nella rete dei 17 laboratori partecipanti ha fornito valori dell'indice di concordanza SODDISFACENTI, nonostante la scarsa ripetibilità dei risultati forniti dai Laboratori 10 e 12.

3.6. Valutazione generale Inter-laboratorio: Accuratezza e Riproducibilità

Codice laboratorio	WNDV		BDV		HV1		WNDV+BDV+EHV-1 simultanea	
	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza	Kappa	Accuratezza
Reproducibilità 15 Labs accurati e precisi (N=900)	1	100%	1	100%	1	100%	1	100%
Reproducibilità 17 Labs (N=1020)	0,977	99,4%	1	100%	0,963	98,8%	0,966	98,3%

La rete dei 17 laboratori partecipanti, includendo nell'analisi anche i 2 laboratori che hanno fornito risultati di accuratezza e ripetibilità non soddisfacenti, ha mostrato la capacità di fornire risultati con accuratezza > 98% e riproducibilità > 0,97.

Tale risultato viene considerato SODDISFACENTE ad indicare le elevate performance delle metodiche RT-PCR utilizzate per la diagnosi singola e simultanea (in parallelo) di *WNDV-BDV-EHV-1*.

In particolare si rilevano sensibilità, specificità e riproducibilità tali da prefigurare un efficace utilizzo di tali metodiche per la diagnosi differenziale e simultanea dei 3 virus nella routine diagnostica della rete dei Laboratori IZZSS.

4. Valutazioni Finali

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 nei confronti dei 3 virus. 2 laboratori hanno invece mostrato minore accuratezza (< 100%) per una o più diagnosi e valori di Kappa < 0,8 a causa di risultati discordanti forniti nelle 3 sedute indipendenti di prova sugli stessi campioni di riferimento.

Nel complesso alla valutazione della Riproducibilità i 17 laboratori inclusi nell'analisi 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 ai 3 virus.

I risultati ottenuti hanno evidenziato elevate sensibilità e specificità diagnostiche dei metodi Real-Time PCR messi a punto per la ricerca simultanea 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 fondamentale ai fini del loro impiego nell'ambito dell'attività di sorveglianza.

Le criticità rilevate nei Laboratori 10 e 12 sono costituite da scarsa accuratezza e ripetibilità. Si ritiene che tali risultati siano stati causati da errori grossolani compiuti nella esecuzione delle prove. Tale considerazione deriva dall'osservazione che in questi 2 laboratori gli "errori" (falsi positivi-falsi negativi) sono occorsi solo in una delle 3 sedute indipendenti.

Bibliografia

- OIE quality standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases – OIE (2003)
- Norma UNI CEI EN ISO IEC 17025 “ Requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e di taratura” Novembre 2000
- Norma ISO 3534-1: metodi statistici per il controllo di qualità -febbraio 2000
- Norma ISO 5725-1: Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione - Parte 1: Principi generali e definizioni – agosto 2004
- Manual of Standard, Diagnostic Test and vaccines O.I.E. (2000 e 2004)
- Fleiss, J. L. (2003). Statistical methods for rates and proportions. 3rd ed. New York: John Wiley, 598-626
- Douglas G. Altman “Practical statistics for medical research”; prima ed., Chapman and Hall, London, 1991 – pag. 403-409



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA

Ricerca finalizzata “Messa a punto di tecniche diagnostiche di laboratorio, ad alto valore predittivo, con particolare riguardo a quelle applicabili per la diagnosi di routine in larga scala”

Report di “Validazione Preliminare di un ELISA Competitiva in Fase Solida per la Ricerca di Anticorpi Verso il Virus della West Nile Disease(WNDV)”

Gian Luca Autorino, Paolo Cordioli, Franco De Simone, Roberto Nardini e Maria Teresa Scicluna

INDICE	2
INTRODUZIONE	3
VALIDAZIONE	5
1. Definizione dello scopo	6
1.1 Idoneità allo scopo	6
1.2 Idoneità all'utilizzo	6
2. Sviluppo del test	7
2.1 Studi sperimentali	7
3. Validazione intralaboratorio	7
3.1 Prove	7
3.2 Reagenti	7
3.3 Pannello dei sieri	7
3.4 Risultati	8
3.5 Criteri di validazione delle prove	10
3.6 Classificazione dei sieri	10
3.7 Accuratezza qualitativa	10
3.7.1 Specificità e sensibilità	10
3.7.2 K di Cohen a 2 e 4 categorie per ogni laboratorio	11
3.7.3 K di Cohen pesato 4 categorie per ogni laboratorio	11
3.7.4 K multiplo	13
3.8 Ripetibilità e riproducibilità	13
3.8.1 Coefficiente di variazione	13
3.8.2 Accordanza	15
3.8.3 Concordanza secondo Langton e COR	16
3.8.3.1 Concordanza secondo Langton	16
3.8.3.2 COR (Concordance Odds Ratio)	17
3.8.4 K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto	18
CONCLUSIONI	19
APPENDICE I	22
APPENDICE II	27
APPENDICE III	36
APPENDICE IV	38
APPENDICE V	47
APPENDICE VI	49
BIBLIOGRAFIA	51

INTRODUZIONE

La West Nile Disease (WND) è una malattia zoonotica non contagiosa, trasmessa da varie specie di zanzare, causata da un arbovirus del genere Flavivirus, famiglia Flaviviridae. Il virus, circola nelle popolazioni di uccelli selvatici e sinantropi sino a quando, in condizioni ecologiche favorevoli, può trasferirsi da queste specie alle zanzare e ancora tramite quest'ultime agli uomini ed agli equidi che rappresentano alcuni ospiti a fondo cieco d'infezione. In seguito al primo focolaio in Italia, che risale al 1998, il Ministero ha deciso di istituire un piano di monitoraggio nazionale volto ad individuare precocemente la possibile circolazione del WNDV in aree a rischio. Le attività previste dal piano consistono in: sorveglianza virologica sia nell'avifauna selvatica di specie migratorie che sinantropica e sugli insetti vettori, sorveglianza clinica, sierologica e virologica negli equidi.

Gli esami sierologici di screening per la diagnosi di WND sono eseguiti impiegando il metodo ELISA, di cui sono disponibili in commercio diversi kit sia per la ricerca di IgG che di IgM. In caso di positività, il campione è riesaminato con il metodo di conferma, rappresentato dal Metodo della Riduzione del Numero delle Placche.

Nell'ambito della ricerca *"Messa a punto di tecniche diagnostiche di laboratorio, ad alto valore predittivo, con particolare riguardo a quelle applicabili per la diagnosi di routine in larga scala"*, l'IZSLER ha, in una prima fase, messo a punto un ELISA competitiva in fase solida per la ricerca di anticorpi totali costituito da un monoclonale (Mab) prodotto nei confronti della Proteina E dominio III (EdIII) del WNDV e dallo stesso virus inattivato, prodotto in cellule. Il metodo necessita di una fase di preadsorbimento delle piastre di 24 ore circa. Nel tentativo di ridurre questo tempo sono state predisposte delle piastre presensibilizzate stabilizzate, simili a quelle disponibili in commercio. La reattività delle piastre è stata valutata tramite una prova interlaboratorio che ha coinvolto i nove laboratori di altrettanti IZS, presenti come unità operative nel progetto.

VALIDAZIONE

La prova oggetto della seguente validazione è un ELISA competitiva in fase solida per la ricerca di anticorpi totali verso il WNDV eseguita su piastre preadsorbite con un Mab specifico, opportunamente stabilizzate, imbustate e messe sottovuoto. Per la validazione del test, e nella seguente trattazione della stessa, sono state seguite le linee guida riportate nel Manuale OIE [1].

1.1 1. Definizione dello scopo del test

1.1 Idoneità allo scopo

Lo scopo di questo test è di monitorare lo stato sierologici degli equidi, come per le sentinelle previste dal piano nazionale WND. Il test è di screening, perciò le eventuali positività devono essere riconfermate con il metodo di riferimento per valutare la specificità del test stesso, e ulteriormente analizzate per la ricerca di IgM al fine di valutare se la positività è dovuta ad un'infezione pregressa o ad una circolazione virale attiva.

1.2. Idoneità all'utilizzo

Oltre che da un punto di vista scientifico, la valutazione di un test deve comprendere anche tutti gli aspetti tecnici e pratici che riguardano il suo impiego e che condizionano la sua accettabilità da parte degli utilizzatori. I requisiti considerati sono i seguenti:

Disponibilità delle attrezzature: attualmente la tecnica ELISA è largamente adottata presso tutti i laboratori e gli stessi sono dotati dei materiali di consumo e delle apparecchiature necessarie all'esecuzione.

Livello di preparazione tecnica e facilità di interpretazione: la procedura di esecuzione richiede il medesimo livello di preparazione necessario all'utilizzo di qualsiasi altro kit ELISA. L'interpretazione della prova si basa su 3 criteri di validazione e sul confronto tra campioni in esame e controllo di reazione. Ogni campione è qualificato inequivocabilmente ed in modo oggettivo.

Disponibilità dei reagenti: il kit è già completo di quasi tutti i reagenti necessari per l'esecuzione della prova. L'utilizzatore si deve fornire solamente di reagenti di facile reperibilità.

Requisiti di trasporto: il kit necessita di essere spedito e mantenuto ad una temperatura che varia, a seconda dei reagenti, tra +4°C e - 20°C, requisito attualmente assicurato dalle principali ditte di spedizioni. L'antigene è inattivato con Betapro-

piolattone 0,05% (v/v) incubando per 2h a 37° e overnight a 4°C. Il controllo di inattivazione viene fatto tramite tre passaggi su cellule VERO.

Sicurezza e biosicurezza: in condizioni di norme generali di sicurezza tutte le fasi di esecuzione non comportano rischi per l'operatore.

Tempo di risposta: il tempo necessario per ottenere l'esito di un campione è di circa 4 ore e 30 minuti. Inoltre questo formato permette di attivare la prova in qualsiasi giorno in quanto non necessita di programmare l'adsorbimento.

2. Sviluppo del test

2.1 Studi sperimentali

L'ELISA è stata messa a punto testando sieri equini di animali vaccinati ed infettati sperimentalmente oltre a sieri di campo campionati nel corso dell'epidemia 2008/2009 e confrontando i risultati con la sieroneutralizzazione. Per le piastre sensibilizzate sono stati fatte analisi comparative con piastre non stabilizzate.

3 Validazione interlaboratorio

3.1 Prova

Ai laboratori è stato chiesto di eseguire tre prove indipendenti (tre diversi operatori o stesso operatore in tempi diversi). È stata inviata congiuntamente ai reagenti la procedura di esecuzione, illustrata in Appendice I.

3.2 Reagenti

Per la prova sono stati forniti ai laboratori i seguenti reagenti:

- 3 piastre presensibilizzate con Mab;
- Antigene inattivato WNDV;
- Anticorpo Mab coniugato con perossidasi.

3.3 Pannello di sieri

A ciascun laboratorio sono stati distribuiti 40 campioni codificati con numero progressivo da 1 a 40. I 40 campioni derivano da un pannello di 20 sieri, ciascuno inviato in doppia aliquota. La reattività attesa dei sieri è stata classificata come SP (Strong Positive), MP (Medium Positive), WP (Weak Positive) o Negativo in relazione al valore di percentuale di inibizione (PI) come riportato nella tabella 1.

Tabella 1: Criteri di classificazione dei sieri in funzione della PI (percentuale di inibizione)

1:5		1:10	
>85%	e	>70%	SP
70%<PI<85%	e	50%<PI<85%	MP
50%<PI<70%	e	<70%	WP
<50%	e	<50%	NEG

Il pannello di sieri era composto da:

1. sieri derivanti da diluizioni (1/3, 1/6, 1/10) di un siero di un equino vaccinato (Soggetto A);
2. sieri derivanti da diluizioni (1/13, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200) di un siero di un altro equino vaccinato (Soggetto B);
3. sieri derivanti da diluizioni (tal quale, 1/3, 1/6) di un siero di un soggetto naturalmente infetto (Soggetto C);
4. sieri derivanti da diluizioni (tal quale, 1/2, 1/3) di un siero di un altro soggetto naturalmente infetto (Soggetto D);
5. siero fetale equino (GIBCO®)

Nella tabella 2 è riportato il dettaglio dei sieri utilizzati.

Tabella 2: Composizione, origine e caratteristiche reattive del pannello di sieri.

	Diluizione	Numero siero pannello 20 sieri	Classificazione	Identificativo siero pannello 40 sieri
Soggetto A	1:3	3	SP	26,33
	1:6	7	MP	8,15
	1:10	11	WP	5,27
Soggetto B	1:13	4	SP	17,21
	1:50	8	SP	6,39
	1:100	12	MP	18,30
	1:150	13	MP	10,38
Soggetto C	1:200	14	WP	12,36
	Tal quale	1	SP	4,40
	1:3	2	SP	9,11
Soggetto D	1:6	9	SP	1,3
	Tal quale	5	MP	16,35
	1:2	6	MP	14,32
Siero fetale equino	1:3	10	SP	20,23
	Tal quale	15	NEG	2,19
	Tal quale	16	NEG	22,29
	Tal quale	17	NEG	31,37
	Tal quale	18	NEG	25,34
	Tal quale	19	NEG	7,13
	Tal quale	20	NEG	24,28

Altri reagenti necessari alla prova sono utilizzati nella routine dai laboratori per l'esecuzione della prova ELISA.

3.4 Risultati

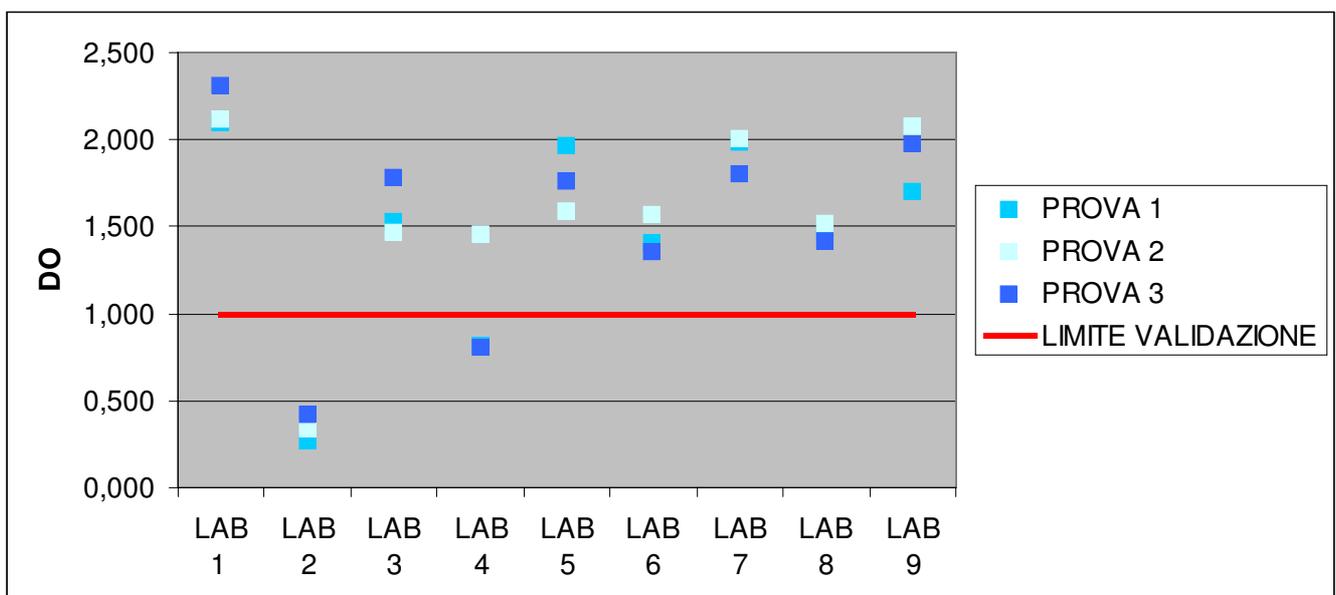
Ai laboratori è stato richiesto di eseguire la prova secondo la procedura fornita e di inviare i risultati compilando un file excel con le sole densità ottiche (DO) dei sieri. Il CERME ha provveduto poi a verificare la validità delle piastre ed a classificare la reattività dei sieri. In Appendice II sono riportati i risultati di tutti i laboratori in termini di DO e PI; in Appendice III sono mostrati i valori dei controlli per ogni laboratorio e per ogni piastra.

3.5 Criteri di validazione delle prove

Sono state considerate valide le prove che hanno rispettato i seguenti criteri di validazione:

- DO medio del controllo di reazione: maggiore di 1,0;
- DO del controllo negativo: inferiore al 50% del PI della media dell'DO dell'antigene in entrambe le diluizioni;
- DO del controllo positivo: uguale o maggiore al 50% del PI della media dell'DO dell'antigene in entrambe le diluizioni.

Delle 27 prove eseguite, 5 sono risultate non valide; di queste, 3 appartenevano al laboratorio 2 e le rimanenti al 4. In figura 1 sono mostrate le medie dei valori di DO delle quattro repliche del controllo di reazione per ogni singolo laboratorio. I dati riferiti all'unica piastra valida del laboratorio 4 sono stati utilizzati solo per l'analisi del CV intralaboratorio. Per gli altri indici di valutazione, queste prove sono state escluse in quanto non fornivano dati con lo stesso peso degli altri laboratori. In alcuni grafici verrà mostrato il confronto tra medie dei laboratori esclusi il 2 ed il 4 e le medie di tutti i laboratori, solo per valutare l'effetto della loro inclusione/esclusione.



3.6 Classificazione dei sieri

Ogni risultato è stato classificato in funzione della PI secondo la tabella 1. La classificazione è stata necessaria per la valutazione dell'accuratezza, della ripetibilità e della riproducibilità qualitativa

3.7 Accuratezza qualitativa

Secondo Langton et al. [2] l'accuratezza qualitativa si stima attraverso la specificità (Sp) e la sensibilità (Se). L'accuratezza è stata anche valutata mediante il K di Cohen, il K di Cohen pesato per ogni singolo laboratorio e il K multiplo di Cohen di tutti i laboratori, confrontando gli esiti ottenuti con quelli attesi.

3.7.1 Specificità e sensibilità

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati dell'ELISA a confronto con il risultato atteso, utilizzando solo 2 categorie (positivo e negativo).

Tabella 3: Confronto tra tecnica atteso e risultati in ELISA

		ATTESO		
		+	-	
TOTALE LAB	+	592	0	Totale
	-	0	248	592
Totale		592	248	840

Per il calcolo della Se e della Sp sono stati utilizzati i rapporti esemplificati nella tabella 4 e nelle formule 1 e 2:

Tabella 4: Tabella di contingenza (2x2) per il confronto tra risultati attesi e ottenuti

	Positivi attesi	Negativi attesi
Positivi al test	a	b
Negativi al test	c	d

(1) $Se = a/(a+c)$

$$(2) Sp = d/(b+d)$$

In tabella 5 sono riportati i valori di Sp e Se che risultano entrambi pari al valore massimo possibile per ogni parametro.

Tabella 5: Valori di Se e Sp

Se (%)	100
Sp (%)	100

3.7.2 K di Cohen (a 2 e 4 categorie) per ogni laboratorio

Al fine di valutare la concordanza dei risultati ricevuti con quelli attesi espressi in due categorie, negativo e positivo, è stato inizialmente utilizzato il K di Cohen. Poiché i sieri inviati ai laboratori erano stati classificati secondo quattro categorie, per valutare più nel dettaglio l'andamento della concordanza si è proceduto alla stima K con 4 categorie.

Il K di Cohen rispetto ad una proporzione di concordanza semplice (numero di concordi sul totale) ha il vantaggio di depurare il K dall'effetto del caso. Infatti il K è definito come riportato nella formula 3 [3]:

$$(3) \quad k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Dove P_o è la proporzione di concordi sul totale e P_e la proporzione attesa per effetto del caso. Nella tabella 6 è esemplificato il confronto tra due osservatori. P_o in questo caso è la somma di a/N e b/N (i risultati concordi tra i due osservatori) e P_e è dato dalla somma dei prodotti dei totali marginali delle caselle dei concordi. Nell'esempio della tabella sottostante $P_e = (a+b/N) * (a+c/N) + (c+d/N) * (b+d/N)$; il primo prodotto è il P_e per i concordi positivi e il secondo il P_e per i concordi negativi. Lo stesso metodo si applica ad M categorie.

Tabella 6: Esempio di tabella di contingenza per il confronto tra due osservatori

	Positivi osservatore A	Negativi osservatore A	
Positivi osservatore B	a/N	b/N	a+b/N
Negativi osservatore B	c/N	d/N	c+d/N
	a+c/N	b+d/N	1

Se prendiamo in considerazione il K di Cohen non pesato con due categorie, il valore è uguale ad 1 per tutti i laboratori eccetto che per il laboratorio 4 (che ha riportato come negativo, e non come positivo, il siero 14 nella prova 3), per il quale è risultato essere 0,98. Il K non pesato con quattro categorie ha fornito dei valori molto inferiori rispetto al K con due categorie, compresi tra 0,48 e 0,69. È prevedibile che il valore di K non pesato con quattro categorie sia più basso in

considerazione del fatto che vengono valutati come non concordi tutti i risultati che si avvicinano anche molto al risultato atteso (MP invece di SP; MP invece di WP e viceversa). Per ovviare a questa distorsione si è proceduto alla stima del K di Cohen pesato.

3.7.3 K di Cohen pesato (4 categorie) per ogni laboratorio

Il K pesato tiene in considerazione anche di quanto il risultato sia lontano dall'atteso, attribuendogli un peso proporzionalmente decrescente, ed ovviando così al problema del K non pesato di considerare totalmente discordi i risultati che in realtà sono molto vicini all'atteso. In tabella 7 sono mostrati i pesi con cui è stato calcolato il K.

Nel nostro studio il K pesato è risultato essere compreso tra 0,7 e 0,81. Il valore di K pesato ottenuto con i nostri dati, secondo tabella interpretativa proposta da Landis et al [4] e riportata in tabella 8 risulta essere indice di un accordo da sostanziale a quasi perfetto.

Riteniamo importante sottolineare come la classificazione del valore del K non pesato, confrontata con quella del K pesato, passi da modesta/sostanziale a sostanziale/quasi perfetto.

Tabella 7: Valori dei pesi assoluti utilizzati in questo studio per il calcolo del K di Cohen pesato

Pesi assoluti della statistica K				
	N	WP	MP	SP
N	1	0,67	0,33	0
WP	0,67	1	0,67	0,33
MP	0,33	0,67	1	0,67
SP	0	0,33	0,67	1

Tabella 8: Criteri di interpretazione di K proposti da J. Richard Landis e Gary G. Koch

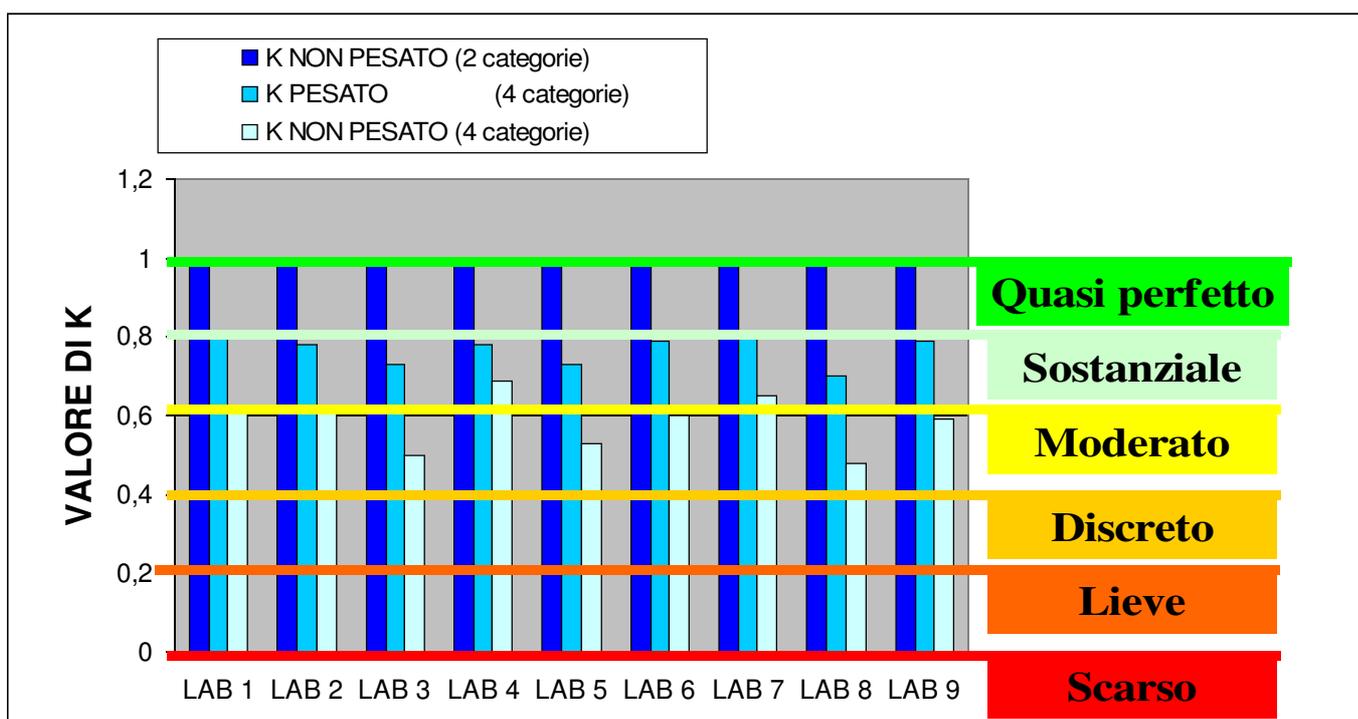
Kappa	Grado di accordo
<0,00	Scarso
0,00-0,20	Lieve
0,21-0,40	Discreto
0,41-0,60	Moderato
0,61-0,80	Sostanziale
0,81-1,00	Quasi perfetto

In tabella 9 e in figura 2, sono mostrati i tre valori di k calcolati per ogni laboratorio.

Tabella 9: valori di K non pesato (2 categorie); K pesato e non pesato (4 categorie)

	K NON PESATO (2 categorie)	K NON PESATO (4 categorie)	K PESATO (4 categorie)
LAB 1	1	0,62	0,81
LAB 2	1	0,62	0,78
LAB 3	1	0,5	0,73
LAB 4	0,98	0,69	0,78
LAB 5	1	0,53	0,73
LAB 6	1	0,6	0,79
LAB 7	1	0,65	0,8
LAB 8	1	0,48	0,7
LAB 9	1	0,59	0,79

Figura 2: valori di K tra tutti i laboratori: non pesato a 2 categorie , non pesato a 4 categorie e pesato a 4 categorie. A destra i gradi di accordo secondo la tabella 8



3.7.4 K multiplo

Il valore del K multiplo è stato calcolato utilizzando come valori di Po e Pe quelli trovati per il K pesato a 4 categorie (Appendice VI). Questo valore di K indica quanto, tutti gli esiti di tutti i laboratori siano concordi rispetto all'atteso. Il valore ottenuto è di 0,76 classificato come sostanziale.

3.8 Ripetibilità e riproducibilità

Considerando la natura della prova ELISA, che fornisce un risultato sia in termini di DO, quindi quantitativo; che di categoria e quindi qualitativo; la valutazione della ripetibilità e della riproducibilità è stata condotta prendendo in considerazione: il coefficiente di variazione (CV), l'accordanza, la concordanza e il Concordance Odds Ratio (COR) secondo Langton, e il K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto [5;6] nelle Appendici V e VI sono mostrati tutti i dati relativi a questi parametri di valutazione.

3.8.1 Coefficiente di variazione

In Appendice IV sono mostrati tutti i dati relativi al CV. È stato valutato il CV tra:

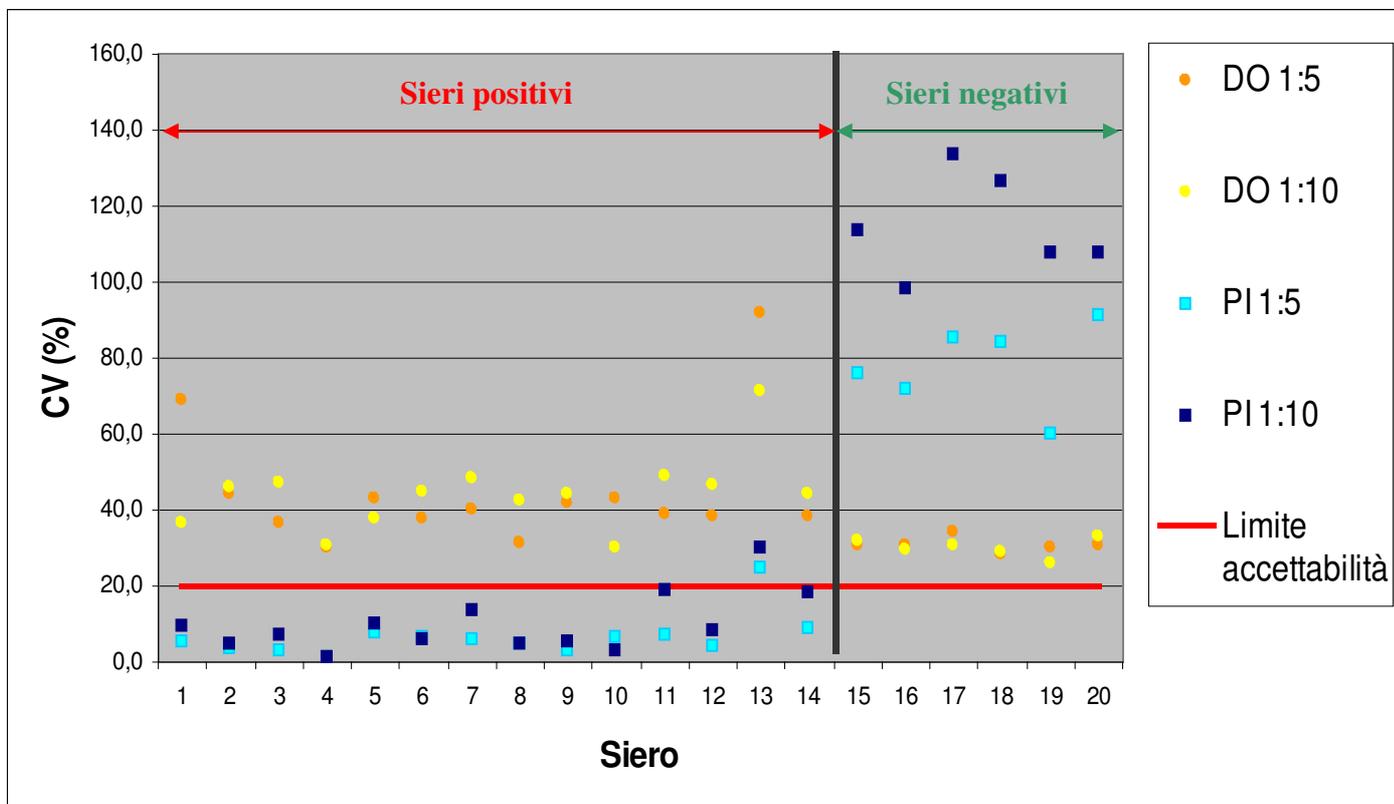
- le due repliche di ognuno dei 20 sieri, all'interno di ogni laboratorio per ogni prova effettuata;
- tutte le repliche (sei) di ognuno dei 20 sieri all'interno di ogni laboratorio;
- tutte le repliche di ciascuno dei 20 sieri considerando globalmente tutti i laboratori.

Il CV è stato calcolato sia per la diluizione 1/5 che per la diluizione 1/10; e sia per la DO che per la PI. È stato ritenuto accettabile un CV pari o inferiore al 20% [7].

Per motivi di chiarezza riportiamo in Figura 3 solo il CV per tutte le repliche e per tutti i laboratori. Nell'analisi dei CV, va considerata la natura competitiva della ELISA in questione: i sieri positivi avranno una DO bassa e una PI alta e viceversa per i negativi. Come possiamo vedere dalla figura, tutti i CV delle DO sono superiori al limite soglia. Per questo motivo si è deciso di adottare come parametro di valutazione il CV delle PI. Infatti, come possiamo vedere dalla figura, le PI dei sieri positivi hanno dei CV molto bassi, inferiori al 10%. Il calcolo della PI infatti neutralizza l'effetto di variabilità intralaboratorio mettendo in relazione le DO delle singole diluizioni del campione con quello del controllo di reazione della piastra. Per i sieri negativi la situazione è diversa: anche prendendo in considerazione la PI il CV è molto alto, più alto del rispettivo CV delle DO. Questo è spiegabile considerando che la PI dei sieri negativi tende allo zero e quindi una minima variazione influenza notevolmente il CV. Da notare anche che alcuni risultati in termini di PI sono di segno negativo, contribuendo quindi ad aumentare l'ampiezza del CV.

Considerando tutto quanto suddetto e che i sieri negativi sono stati classificati correttamente (come mostrato precedentemente nel capitolo sull'accuratezza), per la nostra valutazione si è tenuto conto solo dei CV dei sieri positivi.

Figura 3: Distribuzione dei CV dei sieri per ogni laboratorio considerando globalmente le tre prove



3.8.2 Accordanza

Secondo Langton [4] l'accordanza è l'equivalente qualitativo della ripetibilità ed è definita come la probabilità che un campione, analizzato in doppio, sotto condizioni di ripetibilità, dia lo stesso risultato qualitativo; indipendentemente dal risultato atteso.

Riassumendo brevemente il metodo utilizzato possiamo dire che l'accordanza è il rapporto percentuale tra: il numero di risultati - per ciascun siero in esame - che, appaiati con gli altri risultati ottenuti dallo stesso laboratorio per quel siero, danno lo stesso risultato; e il numero totale di coppie possibili. Dato un numero n di risultati disponibili per ogni siero possiamo calcolare il numero di possibili accoppiamenti utilizzando la formula 4:

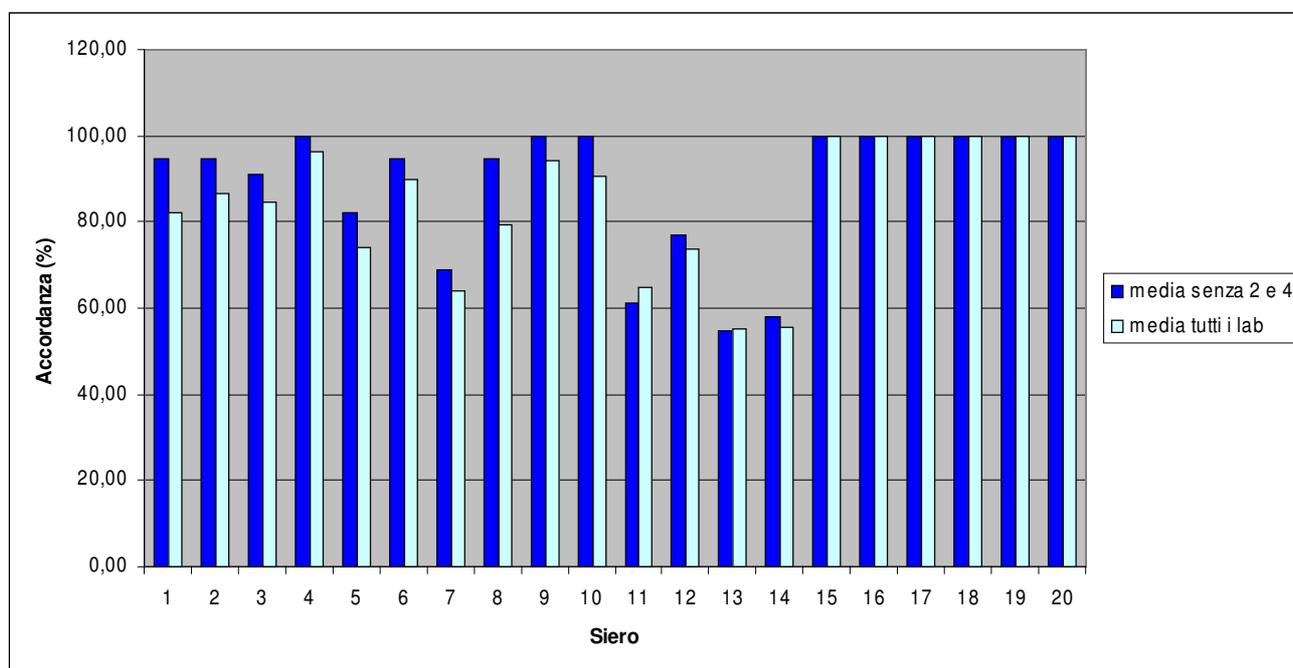
$$(4) C = \frac{n(n-1)(n-2) \dots (n-k+1)}{n!}$$

C= numero di combinazioni possibili
n= numero di risultati

k= numero di risultati per ogni
combinazione

In figura 4 sono mostrati i valori medi di accordanza per ogni siero per tutti i laboratori e quelli medi escludendo i due laboratori con prove non validabili (laboratorio 2 e 4). Come si può desumere osservando la figura, per la maggior parte dei sieri, l'accordanza calcolata sui 7 laboratori è più alta rispetto a quella calcolata su tutti i laboratori; in tre casi (siero 4,9,10) l'accordanza epurata dalle prove non valide arriva al 100%. Per i sieri negativi invece è risultata pari al 100% in entrambi i casi.

Figura 4: Valori medi di accordanza per ogni siero tra tutti i laboratori confrontati con quelli medi escludendo i laboratori 2 e 4.



3.8.3 Concoranza secondo Langton e COR

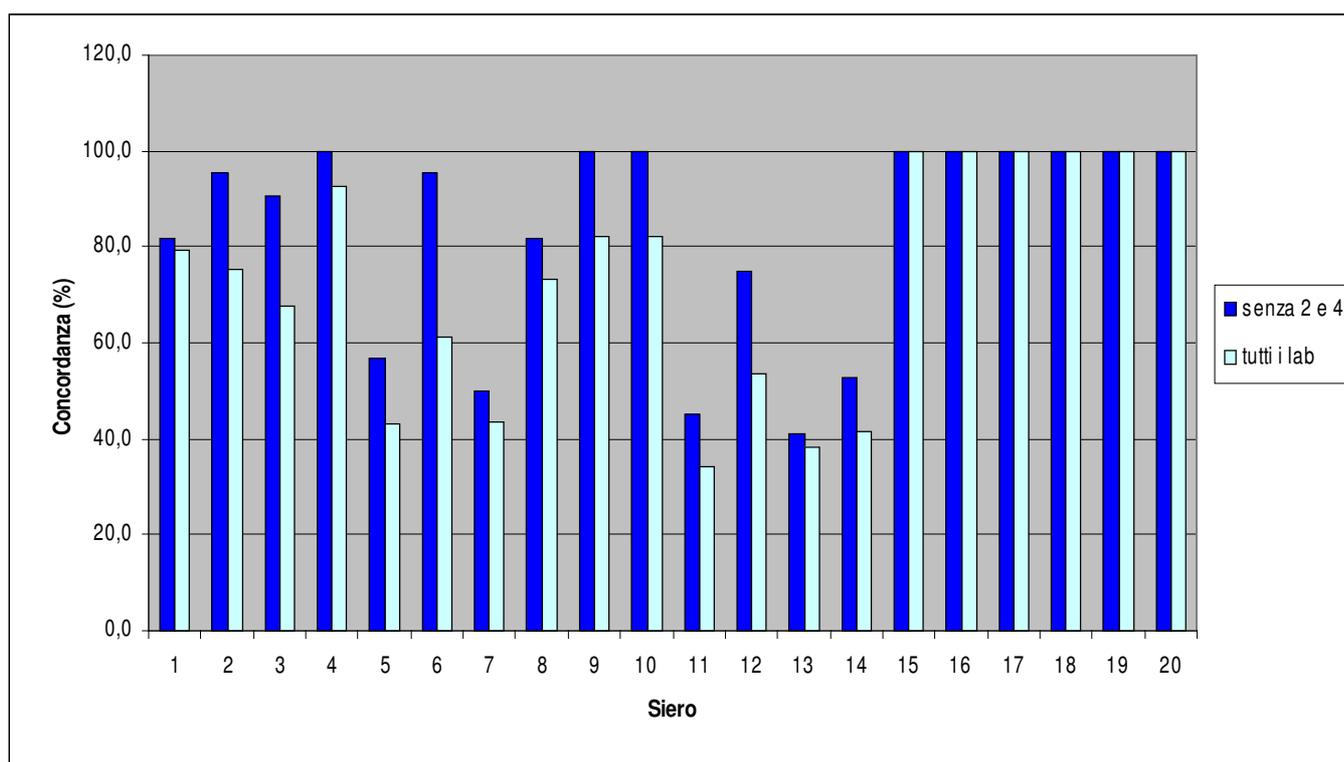
La riproducibilità qualitativa è stata valutata calcolando la concordanza media per siero secondo quanto proposto da Langton [4]. Mettendo in relazione l'accordanza e la concordanza tramite la formula della COR abbiamo valutato ulteriormente la variabilità interlaboratorio.

3.8.3.1 Concoranza secondo Langton

La concordanza è, per i dati qualitativi, l'equivalente della riproducibilità ed è definita come la probabilità che lo stesso campione inviato a due laboratori dia lo stesso risultato. Si può calcolare accoppiando ciascun risultato per un determinato siero con tutti i risultati, per quel siero, ottenuti dagli altri laboratori. In figura 5 sono mostrati i valori medi di concordanza per ogni siero tra tutti i laboratori e quelli

medi escludendo i due laboratori con prove non validabili. Per la maggior parte dei sieri la concordanza calcolata sui 7 laboratori è più alta rispetto a quella calcolata su tutti i laboratori, in tre casi (siero 4,9,10) la concordanza epurata dalle prove non valide arriva al 100%. Per i sieri negativi invece è risultata pari al 100% in entrambi i gruppi.

Figura 5: Valori medi di concordanza per ogni siero tra tutti i laboratori confrontati con quelli medi escludendo i laboratori 2 e 4.

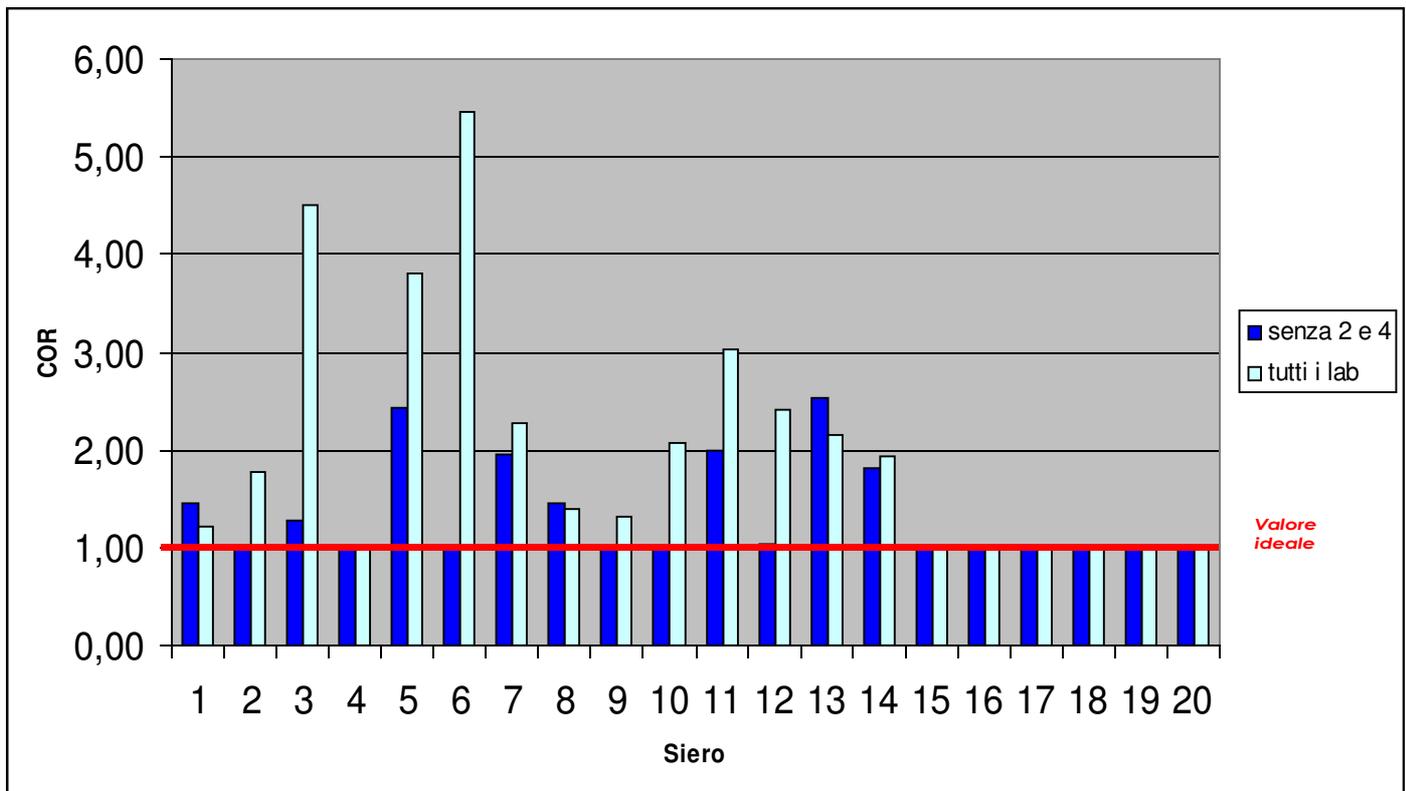


3.8.3.2 COR (Concordance odds ratio)

Possiamo stimare ulteriormente la variabilità tra i laboratori confrontando i valori di accordanza e concordanza. Logicamente, se la concordanza è minore dell'accordanza si può dedurre che vi sia una variabilità interlaboratorio maggiore di quella intralaboratorio, cioè che un campione analizzato all'interno dello stesso laboratorio ha più probabilità di dare lo stesso risultato rispetto a quando viene

analizzato in laboratori diversi. Visto che sia la concordanza che l'accordanza sono fortemente dipendenti dalla sensibilità (che comunque nel nostro caso è risultata essere pari al 100%), è utile calcolare il COR, meno influenzata dal livello di sensibilità. Il valore di COR può essere interpretato come la probabilità relativa di ottenere lo stesso risultato quando un campione analizzato nello stesso laboratorio rispetto a quando è analizzato in laboratori diversi. Il valore ottimale di COR dovrebbe essere più vicino possibile ad 1. Valori maggiori o minori di 1 indicano rispettivamente una maggiore o minore variabilità interlaboratorio rispetto alla intralaboratorio. In figura 6 sono mostrati i valori COR per ogni siero tra tutti i laboratori e quelli escludendo i due laboratori con prove non validabili. Nella maggioranza dei casi i valori di COR si avvicinano sensibilmente ad 1 se si escludono i laboratori con prove non validabili. In particolare per il siero 6 la COR passa da 5,47 a 1,01; per il siero 12 da 2.42 a 1.03. Per i sieri negativi invece è risultata pari a 1 in entrambi i casi.

Figura 6: Valori di COR (Concordance Odds Ratio) per ogni siero tra tutti i laboratori confrontati con quelli medi escludendo i laboratori 2 e 4.



3.8.4 K totale non confrontato con l'atteso secondo Quatto

In tabella 10 sono mostrati i valori di K considerando tutti i laboratori ed escludendo i laboratori con prove non validabili. Questa concordanza, a differenza delle precedenti, non viene calcolata considerando l'atteso ma stima solo quanto i laboratori siano concordi tra loro nell'espressione dei risultati.

Tabella 10: Valore di K tra tutti i laboratori ed escludendo i laboratori 2 e 4.

K	senza 2 e 4	tutti i lab
	0,72	0,60

Prendendo in considerazione il valore 0,72, questo risulta, secondo la tabella proposta da *Landis et al.*, interpretabile come accordo sostanziale, indicando quindi una buona riproducibilità.

CONCLUSIONI

CONCLUSIONI

Il circuito interlaboratorio rientra, secondo il manuale OIE [1], nei metodi per la validazione di un test.

Il test ha mostrato di possedere le caratteristiche di idoneità per lo scopo prefissato. Si è dimostrato stabile in quanto le DO dei controlli di reazione si sono mantenuti costanti nel tempo in cui sono state eseguite le tre prove.

Riguardo all'accuratezza del test si è dimostrata adeguata, in quanto:

1. la sensibilità e la specificità sono risultate pari al 100%, indicando ottime qualità diagnostiche;
2. i valori di K di Cohen e di K multiplo indicano un accordo da sostanziale a quasi perfetto rispetto all'atteso.

La ripetibilità quantitativa può essere valutata come buona in quanto:

1. il CV tra le coppie di sieri all'interno di ogni prova, considerando il PI dei sieri positivi, si è mostrato inferiore al 20 % nella quasi totalità dei casi;
2. l'accordanza, indice di valutazione della ripetibilità qualitativa, si può ritenere soddisfacente in quanto prossima al 100% per più della metà dei sieri.

Per la riproducibilità qualitativa possiamo giungere alle stesse conclusioni in quanto:

1. i CV per ogni siero all'interno di ogni laboratorio considerando le tre prove insieme e il CV di ogni siero tra tutti i laboratori e tutte le prove, si sono mostrati, nella quasi totalità dei casi, inferiore al 20 %;
2. i valori di concordanza secondo Langton, come per l'accordanza, sono prossimi al 100% per più della metà dei sieri;
3. la COR è risultata essere prossima ad uno per tutti i sieri ad eccezione di due, per i quali comunque risultava essere al massimo 2,53;
4. il valore di K secondo Quatto è risultato essere 0,76, indice di un accordo sostanziale.

Anche se per l'accordanza e la concordanza sono stati ottenuti valori minimi di 61,14% e 41,3 % rispettivamente, è da sottolineare che questi valori sono conseguenti non ad una classificazione errata tra positivo e negativo ma ad una diversa classificazione di intensità di positività; infatti si ribadisce che sia la sensibilità che la specificità sono pari al 100%.

CONCLUSIONI

Si può pertanto concludere che tutti i parametri valutati per questo test (accuratezza, ripetibilità e riproducibilità) hanno dato risultati molto soddisfacenti. Tuttavia, per soddisfare completamente i criteri di validazione OIE, il lavoro dovrà essere integrato sottoponendo ad analisi un maggior numero di sieri di campo e verificando la specificità del metodo anche con campioni positivi per altri flavivirus circolanti nel nostro territorio (Usutu virus).

Procedura d'esecuzione dell'ELISA per la ricerca di anticorpi verso il virus della West Nile Disease (WNDV) per la validazione del metodo.

1. PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo viene impiegato per la ricerca di anticorpi diretti contro WNDV. Nella metodica viene impiegato un antigene inattivato e due anticorpi monoclonali (Mab), diretti contro epitopi del virus.

Lo schema della reazione prevede una prima fase di "contatto" dell'antigene con uno dei due Mab (catcher), precedentemente adsorbito alla piastra ELISA.

Successivamente a questa prima incubazione, viene aggiunto il campione in esame e dopo, senza il lavaggio del pozzetto, viene aggiunto il secondo Mab (tracer), coniugato con l'enzima perossidasi (HRP): l'eventuale presenza, nel siero in esame, di anticorpi diretti contro il WNDV ostacola l'interazione tra gli epitopi virali e uno o tutti e due i Mab. In entrambi i casi, si avrà l'inibizione dello sviluppo della colorazione, che dovrebbe seguire all'aggiunta del substrato cromogeno dell'HRP. La positività di un campione determina quindi l'inibizione dello sviluppo della colorazione.

La tecnica prevede le seguenti fasi:

- 1) ciclo di lavaggi della micropiastra preadsorbita con il Mab
- 2) distribuzione dell'antigene inattivato del WNDV ed incubazione
- 3) allestimento delle diluizioni di esame dei campioni sulla piastra di diluizione
- 4) ciclo di lavaggi della piastra adsorbita con Mab/antigene
- 5) aggiunta dei sieri in esame sulla piastra adsorbita di Mab/antigene ed incubazione
- 6) aggiunta ed incubazione del Mab "tracer" ed incubazione
- 7) ciclo di lavaggi
- 8) distribuzione del substrato cromogeno e successivo arresto della reazione
- 9) lettura della densità ottica

NB: La prediluizione dei sieri in esame è eseguita su una piastra a 96 pozzetti con fondo a "U", detta piastra di diluizione, che deve essere in plastica "inerte" e non permette l'adsorbimento dei sieri; la competizione tra i sieri in esame ed i due Mab viene invece eseguita in una seconda piastra a 96 pozzetti ("Nunc Maxisorp"), detta piastra di rilevamento.

2. APPARECCHIATURE

Micropipettatrice multicanale in grado di erogare volumi variabili da 10-50 μ l

Micropipettatrice multicanale in grado di erogare volumi variabili da 50-250 μ l

Micropipettatrice singola in grado di erogare volumi variabili da 10-20 μ l

Micropipettatrice singola in grado di erogare volumi variabili da 20-200 μ l

Pipettatrice

Incubatore termostatico (+ 37°C \pm 3°C)

Agitatore rotante per micropiastre (opzionale)

Agitatore per micropiastre

Frigorifero (+ 4°C \pm 2°C)

Congelatore (-20°C \pm 5°C)

Fotometro per la lettura in assorbanza delle micropiastre (λ utilizzata 490-492 nm),

Sistema di lavaggio per piastre (opzionale, consigliabile in caso si eseguano esami impiegando contemporaneamente numerose piastre)

pHmetro

3. MATERIALI DI LABORATORIO

CONCLUSIONI

Micropiastre a 96 pozzetti con fondo piatto (Nunc Maxisorp o altro articolo verificato come idoneo)

Micropiastre a 96 pozzetti in plastica "inerte"

Coperchi per micropiastre

Puntali

Vaschette porta reagenti

Pipette, provette e vetreria di volume adeguato per la preparazione dei reagenti

4. REAGENTI

4.1. Piastra preadsorbita con il Mab catcher

Conservazione: in frigorifero a temperatura $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

4.2. Antigene WNDV inattivato

Criolistato di antigene WNDV inattivato

Conservazione: in congelatore a temperatura $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Titolo d'uso: 1:10

NB: preparare la soluzione, di volta in volta, solo immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente (vedi punto 4.8)

4.3. Anticorpo monoclonale con persossidasi "tracer"

In soluzione di 50% glicerina/50% PBS

Conservazione: in congelatore a temperatura di $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Titolo d'uso: 1:300

NB: Preparare la diluizione d'uso, di volta in volta, solo immediatamente prima dell'uso in Tampone Diluente (vedi punto 4.8)

4.4. Siero di controllo negativo

Siero di cavallo negativo per la presenza di anticorpi nei confronti del WNDV

In soluzione di 50% glicerina/50% siero

Conservazione: in congelatore a temperatura $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Titolo d'uso: tal quale

4.5. Siero di controllo positivo

Siero equino vaccinato nei confronti del WNDV positivo per la presenza di anticorpi nei confronti del WNDV

In soluzione di 50% glicerina/50% siero

Conservazione: in congelatore a temperatura $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$

Titolo d'uso: tal quale

4.6. Tampone PBS

Composizione per litro:

cloruro di sodio 8 g

potassio cloruro 0,2 g

sodio fosfato bibasico x 12H₂O 2,9 g

potassio fosfato monobasico 0,2 g

acqua demineralizzata quanto basta a 1000 ml

Preparazione: sciogliere i sali nell'acqua mediante agitazione, controllare il pH (7,4 \pm 0,2)

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: tre mesi

4.7. Tampone Lavaggio

Composizione:

PBS pH 7,4 \pm 0,2, contenente Tween 20

(Polyoxyethylene-sorbitan monolaureate) allo 0,05% v/v

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: sette giorni

4.8. Tampone Diluente (TD)

Composizione:

Tampone Lavaggio contenente estratto di lievito al'1% v/v

Conservazione: +4 °C ± 2 °C

Validità: tre mesi

Categoria di rischio: l'acido citrico (R41-37/38; S26-36) e irritante per le vie respiratorie e la pelle

4.10. Soluzione Substrato Cromogeno

Composizione per litro:

OPD (ortophenylendiamine in pasticche pre-pesate) 0,5 mg/ml

H₂O₂ (perossido di idrogeno) allo 0,02%,

abituamente vengono usate soluzioni al 30% o al

35%; manipolare con guanti protettivi

Preparazione:

Sciogliere le pasticche di OPD nel volume appropriato di tampone fosfato-citrato (vedi punto 12), portato a temperatura ambiente. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere H₂O₂ in concentrazione dello 0,02% finale (esempio: H₂O₂ al 30% deve essere diluito 1/1500; H₂O₂ al 35% deve essere diluito 1/1750; per un volume di 21 ml di soluzione di OPD, aggiungere 14 µl di H₂O₂ al 30% o 12 µl di H₂O₂ al 35%)

Conservazione:

La soluzione di OPD eventualmente preparata in eccesso, prima dell'aggiunta di H₂O₂, può essere aliquotata e conservata in congelatore a -20°C – 5°C.

Tali aliquote andranno scongelata al buio subito prima dell'uso. Eliminare la soluzione se al momento dell'impiego si nota un viraggio anche lieve della soluzione da incolore a giallo. Dopo l'aggiunta dell' H₂O₂, la soluzione non è stabile ed è anche fotosensibile, pertanto, deve essere utilizzata immediatamente.

Validità: tre mesi

Categoria di Rischio: l'OPD in polvere è potenzialmente cancerogeno (R45, 20-22, 36-38, 42,43; S 45, 26, 36-37, 39).

Tuttavia, la concentrazione di OPD nella soluzione d'uso è inferiore ai limiti di legge previsti per l'apposizione di specifiche frasi di rischio. Manipolare polvere e soluzioni indossando guanti protettivi. Eliminare la soluzione in eccedenza secondo le procedure previste.

4.11. Soluzione di arresto: Acido solforico (H₂SO₄) 1M

Composizione: Acido solforico (96%) 56 ml

Acqua distillata quanto basta a 1000 ml

Preparazione: Aggiungere lentamente e con cautela l'acido all'acqua, quindi portare a volume. Evitare assolutamente di effettuare l'operazione inversa.

Conservazione: temperatura ambiente

Validità: 12 mesi

5. PROCEDURA DELLA PROVA – tutti i reagenti devono essere usati a temperatura ambiente e qualora fossero in soluzione devono essere agitate energicamente prima dell'uso

5.1 LAVAGGIO DELLA PIASTRA PRESENSIBILIZZATA

Distribuire in ogni pozzetto 200 – 300 µl di tampone di lavaggio ed attendere almeno 2 minuti. Ripetere tale operazione 3 volte. Trascorso tale periodo, vuotare i

CONCLUSIONI

pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

5.2 AGGIUNTA DELL'ANTIGENE INATTIVATO DEL WNDV

Aggiungere ad ogni pozzetto della piastra presensibilizzata, 50µl di Ag diluito in TD ed incubare la piastra per 37°C per 90 minuti.

5.3 LAVAGGIO DELLA PIASTRA SENSIBILIZZATA Mab/Ag

Distribuire in ogni pozzetto 200 – 300 µl di tampone di lavaggio ed attendere. Ripetere tale operazione 3 volte. Trascorso tale periodo, vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.

5.4 ALLESTIMENTO DELLA PIASTRA DI DILUIZIONE

Si riporta lo schema di distribuzione di sieri e controlli nella "Piastra di diluizione" (figura 1). Lo schema si riferisce ad una piastra completa e, per ragioni di praticità, la procedura sotto riportata fa riferimento ad essa; qualora si usassero schemi di distribuzione diversi, assicurarsi che siano rispettate le diluizioni ed il numero delle repliche previste per i controlli ed i sieri in esame.

Nota: Questo schema di distribuzione consente un riconoscimento immediato della corretta posizione dei campioni nel momento in cui vengono trasferiti dalla piastra di diluizione a quella di rilevamento per averli, dopo questa operazione, in doppia replica.

Figura 1 - Piastra di diluizione /Piastra di rilevamento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
C	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
D	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
E	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	K+	CR
F	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	K+	CR
G	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	K-	CR
H	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	K-	CR

n°Siero	1.5
	1:10

Durante l'incubazione dell'antigene, distribuire in una piastra di plastica inerte a 96 pozzetti, fondo U, i sieri da esaminare diluiti come segue:

- per la diluizione 1/5, distribuire 160 µl di TD + 40 µl di siero
- per la diluizione 1/10, distribuire 50 µl di 1/5 in 50 µl di TD
- i sieri di controllo positivo e negativo sono trattati come i sieri in esame
- per il controllo antigene, aggiungere 100 µl di TD in ciascun pozzetto dedicato

5.5 TRASFERIMENTO DEI CONTROLLI, DEI SIERI IN ESAME E DELL'ANTIGENE NELLA PIASTRA DI RILEVAMENTO

- Terminata l'incubazione al punto 5.2, trasferire come riportato in figura 1, 50 µl dei sieri diluiti, compresi i controlli, dalla piastra di diluizione a quella di rilevamento.
- Incubare a 37°C per 60 minuti.

5.6 AGGIUNTA Mab tracer

Senza lavare, aggiungere 25 µl di Mab tracer diluito in TD in ogni pozzetto in esame ed incubare la piastra per 37°C per 90 minuti.

5.7 LAVAGGIO

- Distribuire in ogni pozzetto 200-300 μ l di tampone di lavaggio
- Attendere almeno 2 minuti e vuotare i pozzetti capovolgendo la micropiastra con movimento deciso per eliminare residui di liquido.
- Ripetere le operazione descritte complessivamente 3 volte.

5.5 REAZIONE CROMOGENA

- Alcuni minuti prima del termine dell'incubazione della piastra di rilevamento, scongelare al buio il substrato cromogeno eventualmente preparato e stoccato.
- Aggiungere l'H₂O₂ al substrato cromogeno alla concentrazione finale dello 0,02%
- Distribuire 50 μ l del substrato in ogni pozzetto
- Incubare per 5-7 minuti a temperatura ambiente controllando l'intensità di sviluppo della reazione.

5.6 BLOCCO DELLA REAZIONE

- Al termine delle operazioni di cui al punto 5.5, aggiungere in tutti i pozzetti 50 μ l della soluzione di arresto.

5.7 LETTURA

- Rilevare immediatamente le assorbanze (DO) dei pozzetti, ad una lunghezza d'onda di 492nm, eseguendo il bianco contro aria.
- Riportare i valori di densità ottica nell'apposito modulo della registrazione dei risultati

APPENDICE II
Valori di OD e PI dei 40 sieri per ogni laboratorio

LABORATORIO 1			PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
			1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	SP	0,073	0,086	96,5	95,9	0,075	0,145	96,4	93,1	0,088	0,131	96,2	94,3
1	40	SP	0,087	0,134	95,8	93,6	0,080	0,120	96,2	94,3	0,071	0,117	96,9	94,9
2	9	SP	0,076	0,119	96,4	94,3	0,118	0,357	94,4	83,1	0,117	0,475	94,9	79,4
2	11	SP	0,097	0,271	95,4	87,0	0,110	0,337	94,8	84,0	0,103	0,412	95,5	82,2
3	26	SP	0,166	0,336	92,1	83,9	0,242	0,514	88,5	75,7	0,238	0,592	89,7	74,4
3	33	SP	0,187	0,032	91,0	98,5	0,224	0,292	89,4	86,2	0,255	0,418	89,0	81,9
4	17	SP	0,062	0,072	97,0	96,6	0,060	0,092	97,2	95,6	0,062	0,099	97,3	95,7
4	21	SP	0,069	0,087	96,7	95,8	0,071	0,109	96,6	94,8	0,071	0,016	96,9	99,3
5	16	MP	0,152	0,367	92,7	82,4	0,296	0,242	86,0	88,5	0,198	0,356	91,4	84,6
5	35	MP	0,149	0,358	92,9	82,9	0,307	0,241	85,5	88,6	0,233	0,397	89,9	82,8
6	14	MP	0,295	0,120	85,9	94,3	0,204	0,150	90,3	92,9	0,232	0,153	90,0	93,4
6	32	MP	0,240	0,110	88,5	94,7	0,224	0,392	89,4	81,4	0,278	0,146	88,0	93,7
7	8	MP	0,277	0,775	86,7	62,9	0,439	0,819	79,2	61,2	0,453	0,932	80,4	59,6
7	15	MP	0,269	0,492	87,1	76,4	0,380	0,784	82,0	62,9	0,416	0,927	82,0	59,9
8	6	SP	0,092	0,199	95,6	90,5	0,128	0,290	93,9	86,3	0,140	0,388	93,9	83,2
8	39	SP	0,115	0,211	94,5	89,9	0,161	0,334	92,4	84,2	0,154	0,362	93,3	84,3
9	1	SP	0,087	0,093	95,8	95,5	0,120	0,340	94,3	83,9	0,014	0,443	99,4	80,8
9	3	SP	0,093	0,268	95,5	87,2	0,163	0,325	92,3	84,6	0,099	0,395	95,7	82,9
10	20	SP	0,191	0,098	90,9	95,3	0,123	0,095	94,2	95,5	0,178	0,122	92,3	94,7
10	23	SP	0,262	0,201	87,5	90,4	0,100	0,091	95,3	95,7	0,131	0,122	94,3	94,7
11	5	WP	0,296	0,606	85,8	71,0	0,429	0,838	79,7	60,3	0,383	0,981	83,4	57,5
11	27	WP	0,271	0,975	87,0	53,3	0,464	0,975	78,0	53,8	0,533	1,145	76,9	50,4
12	18	MP	0,153	0,336	92,7	83,9	0,239	0,624	88,7	70,4	0,212	0,608	90,8	73,7
12	30	MP	0,207	0,397	90,1	81,0	0,324	0,583	84,7	72,4	0,394	0,636	82,9	72,5
13	10	MP	0,300	0,606	85,6	71,0	0,401	0,787	81,0	62,7	0,395	0,897	82,9	61,2
13	38	MP	0,318	0,552	84,8	73,6	0,401	0,781	81,0	63,0	0,420	0,812	81,8	64,8
14	12	WP	0,372	0,732	82,2	65,0	0,440	0,849	79,2	59,8	0,421	0,987	81,8	57,3
14	36	WP	0,367	0,630	82,4	69,8	0,489	0,909	76,8	57,0	0,492	0,937	78,7	59,4
15	2	NEG	1,601	1,902	23,4	9,0	1,727	1,825	18,2	13,6	1,719	2,083	25,6	9,8
15	19	NEG	1,611	1,861	22,9	10,9	1,832	1,982	13,2	6,1	1,575	2,183	31,8	5,5
16	22	NEG	1,771	1,341	15,2	35,8	1,864	2,007	11,7	4,9	1,564	2,060	32,3	10,8
16	29	NEG	1,517	1,900	27,4	9,0	1,884	2,045	10,8	3,1	1,677	2,146	27,4	7,1
17	31	NEG	1,718	1,932	17,8	7,5	1,846	1,996	12,6	5,5	1,721	2,104	25,5	8,9
17	37	NEG	1,818	2,035	13,0	2,6	1,904	2,244	9,8	-6,3	1,735	2,055	24,9	11,0
18	25	NEG	1,791	2,211	14,3	-5,8	1,753	1,985	17,0	6,0	1,454	2,143	37,0	7,2
18	34	NEG	1,769	1,998	15,3	4,4	1,862	2,043	11,8	3,2	1,726	2,223	25,3	3,8
19	7	NEG	1,684	1,914	19,4	8,4	1,826	2,059	13,5	2,5	1,499	2,098	35,1	9,2
19	13	NEG	1,660	1,933	20,5	7,5	1,685	1,902	20,2	9,9	1,487	2,068	35,6	10,5
20	24	NEG	1,647	2,147	21,2	-2,8	1,691	2,054	19,9	2,7	1,542	2,020	33,2	12,5
20	28	NEG	1,602	1,900	23,3	9,0	1,751	2,002	17,1	5,2	1,625	2,153	29,6	6,8

APPENDICE II

LABORATORIO 2			PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
			1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10		
1	4	SP	0,040	0,056	84,6	78,4	0,080	0,055	76,0	83,5	0,044	0,054	89,5	87,1
1	40	SP	0,038	0,050	85,3	80,7	0,060	0,051	82,0	84,7	0,042	0,051	90,0	87,8
2	9	SP	0,050	0,067	80,7	74,2	0,065	0,111	80,5	66,8	0,051	0,107	87,8	74,4
2	11	SP	0,050	0,066	80,7	74,5	0,072	0,083	78,4	75,1	0,046	0,062	89,0	85,2
3	26	SP	0,048	0,058	81,5	77,6	0,079	0,101	76,3	69,8	0,063	0,085	84,9	79,7
3	33	SP	0,054	0,080	79,2	69,1	0,084	0,109	74,9	67,4	0,069	0,115	83,5	72,5
4	17	SP	0,040	0,048	84,6	81,5	0,046	0,049	86,2	85,3	0,039	0,046	90,7	89,0
4	21	SP	0,038	0,040	85,3	84,6	0,039	0,044	88,3	86,8	0,041	0,042	90,2	90,0
5	16	MP	0,068	0,105	73,8	59,5	0,087	0,096	74,0	71,3	0,071	0,114	83,0	72,7
5	35	MP	0,058	0,096	77,6	63,0	0,112	0,105	66,5	68,6	0,101	0,112	75,9	73,2
6	14	MP	0,081	0,066	68,8	74,5	0,069	0,098	79,3	70,7	0,100	0,071	76,1	83,0
6	32	MP	0,112	0,055	56,8	78,8	0,078	0,058	76,6	82,6	0,102	0,065	75,6	84,5
7	8	MP	0,065	0,091	74,9	64,9	0,093	0,134	72,2	59,9	0,075	0,101	82,1	75,9
7	15	MP	0,070	0,134	73,0	48,3	0,110	0,131	67,1	60,8	0,082	0,126	80,4	69,9
8	6	SP	0,044	0,048	83,0	81,5	0,050	0,068	85,0	79,6	0,048	0,059	88,5	85,9
8	39	SP	0,041	0,053	84,2	79,6	0,123	0,086	63,2	74,3	0,065	0,094	84,5	77,5
9	1	SP	0,047	0,072	81,9	72,2	0,119	0,118	64,4	64,7	0,053	0,086	87,3	79,4
9	3	SP	0,056	0,090	78,4	65,3	0,091	0,085	72,8	74,6	0,043	0,066	89,7	84,2
10	20	SP	0,057	0,055	78,0	78,8	0,060	0,052	82,0	84,4	0,068	0,057	83,7	86,4
10	23	SP	0,059	0,059	77,2	77,2	0,056	0,055	83,2	83,5	0,062	0,051	85,2	87,8
11	5	WP	0,078	0,149	69,9	42,5	0,122	0,171	63,5	48,8	0,095	0,177	77,3	57,7
11	27	WP	0,081	0,116	68,8	55,3	0,137	0,207	59,0	38,0	0,103	0,183	75,4	56,2
12	18	MP	0,054	0,065	79,2	74,9	0,100	0,112	70,1	66,5	0,062	0,097	85,2	76,8
12	30	MP	0,053	0,076	79,6	70,7	0,086	0,112	74,3	66,5	0,071	0,112	83,0	73,2
13	10	MP	0,063	0,072	75,7	72,2	0,106	0,135	68,3	59,6	0,071	0,126	83,0	69,9
13	38	MP	0,058	0,083	77,6	68,0	0,211	0,138	36,8	58,7	0,072	0,125	82,8	70,1
14	12	WP	0,074	0,095	71,5	63,4	0,126	0,165	62,3	50,6	0,081	0,143	80,6	65,8
14	36	WP	0,093	0,134	64,1	48,3	0,115	0,179	65,6	46,4	0,065	0,157	84,5	62,5
15	2	NEG	0,294	0,312	-13,4	-20,3	0,501	0,313	-50,0	6,3	0,361	0,343	13,7	18,0
15	19	NEG	0,212	0,244	18,2	5,9	0,335	0,331	-0,3	0,9	0,238	0,339	43,1	18,9
16	22	NEG	0,273	0,306	-5,3	-18,0	0,415	0,354	-24,3	-6,0	0,272	0,350	35,0	16,3
16	29	NEG	0,240	0,336	7,4	-29,6	0,368	0,381	-10,2	-14,1	0,333	0,359	20,4	14,2
17	31	NEG	0,258	0,323	0,5	-24,6	0,279	0,406	16,5	-21,6	0,334	0,349	20,1	16,6
17	37	NEG	0,347	0,353	-33,8	-36,2	0,485	0,379	-45,2	-13,5	0,282	0,366	32,6	12,5
18	25	NEG	0,295	0,355	-13,8	-36,9	0,396	0,430	-18,6	-28,7	0,293	0,406	29,9	2,9
18	34	NEG	0,102	0,176	60,7	32,1	0,217	0,303	35,0	9,3	0,209	0,308	50,0	26,4
19	7	NEG	0,301	0,336	-16,1	-29,6	0,319	0,389	4,5	-16,5	0,323	0,368	22,8	12,0
19	13	NEG	0,236	0,309	9,0	-19,2	0,372	0,335	-11,4	-0,3	0,258	0,360	38,3	13,9
20	24	NEG	0,255	0,321	1,6	-23,8	0,346	0,329	-3,6	1,5	0,281	0,374	32,8	10,6
20	28	NEG	0,269	0,308	-3,8	-18,8	0,379	0,371	-13,5	-11,1	0,264	0,386	36,9	7,7

LABORATORIO 3	PROVA 1	PROVA 2	PROVA 3
---------------	---------	---------	---------

APPENDICE II

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
			1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	SP	0,122	0,118	92,0	92,2	0,094	0,098	93,6	93,3	0,138	0,168	92,2	90,5
1	40	SP	0,203	0,220	86,7	85,5	0,486	0,110	66,8	92,5	0,152	0,176	91,4	90,1
2	9	SP	0,102	0,090	93,3	94,1	0,109	0,083	92,5	94,3	0,173	0,299	90,2	83,1
2	11	SP	0,124	0,100	91,8	93,4	0,111	0,092	92,4	93,7	0,172	0,226	90,3	87,3
3	26	SP	0,126	0,094	91,7	93,8	0,159	0,094	89,1	93,6	0,234	0,318	86,8	82,1
3	33	SP	0,174	0,163	88,6	89,3	0,126	0,146	91,4	90,0	0,195	0,358	89,0	79,8
4	17	SP	0,086	0,084	94,3	94,5	0,077	0,076	94,7	94,8	0,111	0,101	93,7	94,3
4	21	SP	0,082	0,073	94,6	95,2	0,081	0,074	94,5	94,9	0,106	0,102	94,0	94,2
5	16	MP	0,163	0,108	89,3	92,9	0,136	0,093	90,7	93,6	0,373	0,474	79,0	73,3
5	35	MP	0,159	0,115	89,5	92,4	0,137	0,131	90,6	91,0	0,319	0,373	82,0	79,0
6	14	MP	0,338	0,134	77,8	91,2	0,157	0,114	89,3	92,2	0,415	0,227	76,6	87,2
6	32	MP	0,246	0,105	83,8	93,1	0,165	0,109	88,7	92,5	0,374	0,231	78,9	87,0
7	8	MP	0,278	0,151	81,7	90,1	0,421	0,153	71,2	89,5	0,477	0,677	73,1	61,8
7	15	MP	0,217	0,138	85,7	90,9	0,167	0,122	88,6	91,7	0,366	0,449	79,4	74,7
8	6	SP	0,099	0,110	93,5	92,8	0,103	0,089	93,0	93,9	0,167	0,254	90,6	85,7
8	39	SP	0,095	0,090	93,8	94,1	0,092	0,089	93,7	93,9	0,157	0,286	91,1	83,9
9	1	SP	0,118	0,112	92,2	92,6	0,100	0,095	93,2	93,5	0,183	0,314	89,7	82,3
9	3	SP	0,228	0,204	85,0	86,6	0,110	0,112	92,5	92,3	0,201	0,341	88,7	80,8
10	20	SP	0,287	0,221	81,1	85,5	0,285	0,140	80,5	90,4	0,190	0,149	89,3	91,6
10	23	SP	0,377	0,213	75,2	86,0	0,272	0,150	81,4	89,7	0,234	0,186	86,8	89,5
11	5	WP	0,325	0,189	78,6	87,6	0,250	0,158	82,9	89,2	0,473	0,652	73,3	63,2
11	27	WP	0,205	0,133	86,5	91,3	0,161	0,135	89,0	90,8	0,473	0,674	73,3	62,0
12	18	MP	0,150	0,104	90,1	93,2	0,123	0,087	91,6	94,0	0,292	0,428	83,5	75,9
12	30	MP	0,273	0,204	82,0	86,6	0,177	0,105	87,9	92,8	0,225	0,211	87,3	88,1
13	10	MP	0,411	0,228	73,0	85,0	0,318	0,146	78,2	90,0	0,573	0,587	67,7	66,9
13	38	MP	0,196	0,133	87,1	91,3	0,203	0,132	86,1	91,0	0,400	0,449	77,4	74,7
14	12	WP	0,361	0,158	76,3	89,6	0,268	0,144	81,7	90,1	0,469	0,640	73,6	63,9
14	36	WP	0,274	0,138	82,0	90,9	0,256	0,155	82,5	89,4	0,503	0,854	71,6	51,8
15	2	NEG	1,373	1,140	9,7	25,0	1,263	0,947	13,6	35,2	1,522	1,711	14,2	3,5
15	19	NEG	1,296	1,041	14,8	31,5	1,221	0,834	16,5	42,9	1,580	1,595	10,9	10,1
16	22	NEG	1,402	1,082	7,8	28,9	1,243	1,026	15,0	29,8	1,569	1,568	11,5	11,6
16	29	NEG	1,299	0,932	14,6	38,7	1,352	0,802	7,5	45,1	1,567	1,575	11,6	11,2
17	31	NEG	1,326	0,898	12,8	41,0	1,295	1,002	11,4	31,5	1,597	1,722	10,0	2,9
17	37	NEG	1,264	1,007	16,9	33,8	1,216	1,075	16,8	26,5	1,547	1,436	12,8	19,0
18	25	NEG	1,301	1,030	14,5	32,3	1,352	0,954	7,5	34,7	1,526	1,468	14,0	17,2
18	34	NEG	1,349	0,992	11,3	34,8	1,218	1,071	16,7	26,7	1,510	1,667	14,9	6,0
19	7	NEG	1,162	1,081	23,6	28,9	1,269	1,071	13,2	26,7	1,648	1,735	7,1	2,2
19	13	NEG	1,515	1,206	0,4	20,7	1,192	0,978	18,5	33,1	1,598	1,553	9,9	12,4
20	24	NEG	1,384	1,003	9,0	34,0	1,408	0,845	3,7	42,2	1,765	1,487	0,5	16,2
20	28	NEG	1,297	0,929	14,7	38,9	1,120	0,805	23,4	44,9	1,560	1,540	12,0	13,2

LABORATORIO 4			PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
SIERO DI	SIERO DEL	RISULTATO	DO	PI	DO	PI	DO	PI

APPENDICE II

PARTENZA	PANNELLO	ATTESO	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	SP	0,163	0,122	80,0	85,0	0,128	0,160	91,2	89,0	0,289	0,312	64,1	61,2
1	40	SP	0,084	0,112	89,7	86,3	0,123	0,163	91,5	88,8	0,112	0,132	86,1	83,6
2	9	SP	0,096	0,205	88,2	74,8	0,133	0,292	90,9	79,9	0,276	0,357	65,7	55,6
2	11	SP	0,109	0,282	86,6	65,4	0,155	0,380	89,3	73,9	0,330	0,390	59,0	51,5
3	26	SP	0,162	0,223	80,1	72,6	0,249	0,334	82,9	77,0	0,136	0,164	83,1	79,6
3	33	SP	0,139	0,222	82,9	72,8	0,203	0,295	86,0	79,7	0,131	0,157	83,7	80,5
4	17	SP	0,078	0,100	90,4	87,7	0,089	0,111	93,9	92,4	0,307	0,341	61,8	57,6
4	21	SP	0,077	0,086	90,6	89,4	0,100	0,107	93,1	92,6	0,092	0,093	88,6	88,4
5	16	MP	0,195	0,367	76,1	55,0	0,315	0,489	78,3	66,4	0,398	0,479	50,5	40,4
5	35	MP	0,228	0,353	72,0	56,7	0,334	0,500	77,0	65,6	0,203	0,260	74,8	67,7
6	14	MP	0,251	0,147	69,2	82,0	0,352	0,210	75,8	85,6	0,451	0,361	43,9	55,1
6	32	MP	0,269	0,136	67,0	83,3	0,374	0,209	74,3	85,6	0,230	0,143	71,4	82,2
7	8	MP	0,157	0,254	80,7	68,8	0,237	0,366	83,7	74,8	0,302	0,456	62,4	43,3
7	15	MP	0,183	0,348	77,5	57,3	0,299	0,514	79,4	64,7	0,366	0,451	54,5	43,9
8	6	SP	0,105	0,194	87,1	76,2	0,133	0,228	90,9	84,3	0,277	0,326	65,6	59,5
8	39	SP	0,110	0,183	86,5	77,5	0,140	0,320	90,4	78,0	0,111	0,144	86,2	82,1
9	1	SP	0,101	0,240	87,6	70,6	0,153	0,316	89,5	78,3	0,298	0,346	62,9	57,0
9	3	SP	0,100	0,245	87,7	69,9	0,135	0,344	90,7	76,3	0,284	0,354	64,7	56,0
10	20	SP	0,125	0,105	84,7	87,1	0,211	0,161	85,5	88,9	0,217	0,352	73,0	56,2
10	23	SP	0,130	0,102	84,0	87,5	0,217	0,155	85,1	89,3	0,128	0,114	84,1	85,8
11	5	WP	0,250	0,415	69,3	49,1	0,349	0,610	76,0	58,1	0,363	0,451	54,9	43,9
11	27	WP	0,307	0,440	62,3	46,0	0,468	0,660	67,8	54,6	0,214	0,292	73,4	63,7
12	18	MP	0,160	0,298	80,4	63,4	0,253	0,485	82,6	66,6	0,352	0,431	56,2	46,4
12	30	MP	0,201	0,289	75,3	64,5	0,290	0,421	80,1	71,1	0,156	0,188	80,6	76,6
13	10	MP	0,252	0,349	69,1	57,2	0,393	0,542	73,0	62,7	0,370	0,545	54,0	32,2
13	38	MP	0,217	0,371	73,4	54,5	0,327	0,517	77,5	64,4	0,181	0,248	77,5	69,2
14	12	WP	0,272	0,494	66,6	39,4	0,455	0,746	68,7	48,7	0,432	0,512	46,3	36,3
14	36	WP	0,216	0,379	73,5	53,5	0,381	0,579	73,8	60,2	0,196	0,218	75,6	72,9
15	2	NEG	0,886	0,924	-8,7	-13,4	1,497	1,588	-2,9	-9,2	0,885	0,911	-10,0	-13,3
15	19	NEG	0,872	0,885	-7,0	-8,6	1,530	1,599	-5,2	-10,0	0,877	0,941	-9,0	-17,0
16	22	NEG	0,888	0,977	-9,0	-19,9	1,609	1,640	-10,6	-12,8	0,733	0,779	8,9	3,1
16	29	NEG	0,928	0,974	-13,9	-19,5	1,607	1,614	-10,5	-11,0	0,768	0,790	4,5	1,8
17	31	NEG	0,943	1,039	-15,7	-27,5	1,595	1,659	-9,7	-14,1	0,797	0,826	0,9	-2,7
17	37	NEG	0,870	0,963	-6,7	-18,2	1,529	1,553	-5,1	-6,8	0,731	0,766	9,1	4,8
18	25	NEG	0,889	0,966	-9,1	-18,5	1,486	1,584	-2,2	-8,9	0,721	0,761	10,4	5,4
18	34	NEG	0,921	1,056	-13,0	-29,6	1,449	1,347	0,4	7,4	0,723	0,280	10,1	65,2
19	7	NEG	0,857	0,947	-5,2	-16,2	1,476	1,544	-1,5	-6,2	0,846	0,911	-5,2	-13,3
19	13	NEG	0,894	1,016	-9,7	-24,7	1,487	1,675	-2,3	-15,2	0,895	0,945	-11,3	-17,5
20	24	NEG	0,933	0,988	-14,5	-21,2	1,499	1,595	-3,1	-9,7	0,634	0,751	21,2	6,6
20	28	NEG	0,910	0,954	-11,7	-17,1	1,578	1,585	-8,5	-9,0	0,769	0,785	4,4	2,4

LABORATORIO 5			PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
SIERO DI	SIERO DEL	RISULTATO	DO	PI	DO	PI	DO	PI

APPENDICE II

PARTENZA	PANNELLO	ATTESO	1:5	1:10										
1	4	SP	0,143	0,164	92,7	40,5	0,132	0,106	91,7	93,3	0,102	0,100	94,2	94,3
1	40	SP	0,112	0,127	94,3	93,5	0,084	0,070	94,7	95,6	0,083	0,086	95,3	95,1
2	9	SP	0,120	0,210	93,9	89,3	0,079	0,112	95,0	92,9	0,130	0,205	92,6	88,4
2	11	SP	0,136	0,255	93,1	87,0	0,097	0,173	93,9	89,1	0,129	0,126	92,7	92,8
3	26	SP	0,191	0,270	90,2	86,2	0,091	0,154	94,3	90,3	0,117	0,162	93,4	90,8
3	33	SP	0,212	0,480	89,2	75,5	0,110	0,171	93,1	89,2	0,121	0,175	93,1	90,1
4	17	SP	0,071	0,079	96,4	96,0	0,069	0,060	95,6	96,2	0,069	0,074	96,1	95,8
4	21	SP	0,061	0,099	96,9	94,9	0,055	0,064	96,5	96,0	0,067	0,072	96,2	95,9
5	16	MP	0,260	0,215	86,7	89,0	0,208	0,261	86,9	83,5	0,175	0,144	90,1	91,8
5	35	MP	0,317	0,186	83,8	90,5	0,229	0,210	85,5	86,7	0,192	0,194	89,1	89,0
6	14	MP	0,228	0,136	88,4	93,1	0,223	0,164	85,9	89,6	0,134	0,115	92,4	93,5
6	32	MP	0,193	0,127	90,1	93,5	0,208	0,124	86,9	92,2	0,134	0,094	92,4	94,7
7	8	MP	0,367	0,708	81,3	63,8	0,158	0,261	90,0	83,5	0,275	0,375	84,4	78,7
7	15	MP	0,400	0,647	79,6	66,9	0,172	0,116	89,1	92,7	0,265	0,386	84,9	78,1
8	6	SP	0,138	0,223	93,0	88,6	0,078	0,117	95,1	92,6	0,133	0,153	92,4	91,3
8	39	SP	0,131	0,366	93,3	81,3	0,096	0,116	93,9	92,7	0,109	0,151	93,8	91,4
9	1	SP	0,122	0,278	93,8	85,8	0,083	0,201	94,8	87,3	0,149	0,243	91,5	86,2
9	3	SP	0,111	0,143	94,3	92,7	0,067	0,084	95,8	94,7	0,091	0,100	94,8	94,3
10	20	SP	0,109	0,064	94,4	96,7	0,158	0,106	90,0	93,3	0,096	0,085	94,5	95,2
10	23	SP	0,134	0,114	93,2	94,2	0,159	0,103	90,0	93,5	0,099	0,091	94,4	94,8
11	5	WP	0,446	0,783	77,2	60,0	0,222	0,354	86,0	77,7	0,297	0,384	83,1	78,2
11	27	WP	0,362	0,776	81,5	60,4	0,196	0,385	87,6	75,7	0,217	0,349	87,7	80,2
12	18	MP	0,229	0,427	88,3	78,2	0,142	0,196	91,0	87,6	0,158	0,241	91,0	86,3
12	30	MP	0,239	0,458	87,8	76,6	0,125	0,201	92,1	87,3	0,136	0,204	92,3	88,4
13	10	MP	0,420	0,688	78,5	64,9	0,211	0,248	86,7	84,3	0,257	0,362	85,4	79,4
13	38	MP	0,376	0,769	80,8	60,7	0,209	0,337	86,8	78,7	0,225	0,358	87,2	79,7
14	12	WP	0,509	0,901	74,0	54,0	0,144	0,229	90,9	85,5	0,336	0,460	80,9	73,9
14	36	WP	0,409	0,759	79,1	61,2	0,228	0,405	85,6	74,4	0,235	0,388	86,6	78,0
15	2	NEG	2,006	2,206	-2,5	-12,7	0,853	0,865	46,2	45,4	1,040	1,247	40,9	29,2
15	19	NEG	1,766	1,927	9,8	1,6	1,031	0,653	34,9	58,8	0,906	1,077	48,5	38,8
16	22	NEG	1,967	2,117	-0,5	-8,1	1,091	1,076	31,1	32,1	1,022	1,076	41,9	38,9
16	29	NEG	1,623	2,040	17,1	-4,2	1,000	1,116	36,9	29,6	0,925	0,876	47,5	50,2
17	31	NEG	2,257	2,330	-15,3	-19,0	1,143	1,227	27,9	22,6	0,977	1,339	44,5	23,9
17	37	NEG	1,591	2,052	18,7	-4,8	1,066	1,268	32,7	20,0	0,897	1,179	49,0	33,0
18	25	NEG	1,732	1,963	11,5	-0,3	0,961	1,066	39,3	32,7	0,973	0,969	44,7	45,0
18	34	NEG	1,654	2,152	15,5	-9,9	0,928	1,132	41,4	28,6	0,941	1,247	46,5	29,2
19	7	NEG	1,663	1,877	15,0	4,1	0,894	1,164	43,6	26,5	0,912	1,169	48,2	33,6
19	13	NEG	1,970	1,977	-0,6	-1,0	0,532	0,740	66,4	53,3	1,046	1,056	40,6	40,0
20	24	NEG	1,692	1,988	13,6	-1,6	1,010	1,138	36,3	28,2	0,968	0,988	45,0	43,9
20	28	NEG	1,676	1,899	14,4	3,0	1,052	1,193	33,6	24,7	0,956	0,936	45,7	46,8

LABORATORIO 6			PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
SIERO DI	SIERO DEL	RISULTATO	DO	PI	DO	PI	DO	PI

APPENDICE II

1	4	SP	0,120	0,155	93,9	92,2	0,124	0,178	93,8	91,1	0,099	0,139	94,5	92,3
1	40	SP	0,125	0,109	93,7	94,5	0,137	0,217	93,2	89,2	0,105	0,161	94,2	91,1
2	9	SP	0,143	0,370	92,8	81,3	0,130	0,397	93,5	80,2	0,108	0,241	94,0	86,6
2	11	SP	0,136	0,274	93,1	86,2	0,133	0,230	93,4	88,5	0,122	0,203	93,2	88,7
3	26	SP	0,173	0,296	91,3	85,1	0,152	0,293	92,4	85,4	0,143	0,242	92,1	86,6
3	33	SP	0,158	0,263	92,0	86,7	0,141	0,266	93,0	86,7	0,092	0,106	94,9	94,1
4	17	SP	0,077	0,091	96,1	95,4	0,093	0,090	95,4	95,5	0,087	0,077	95,2	95,7
4	21	SP	0,072	0,089	96,4	95,5	0,071	0,088	96,5	95,6	0,075	0,086	95,8	95,2
5	16	MP	0,278	0,447	86,0	77,4	0,414	0,497	79,3	75,2	0,305	0,455	83,1	74,8
5	35	MP	0,345	0,462	82,6	76,7	0,437	0,409	78,2	79,6	0,371	0,411	79,4	77,2
6	14	MP	0,326	0,154	83,5	92,2	0,329	0,175	83,6	91,3	0,355	0,152	80,3	91,6
6	32	MP	0,349	0,160	82,4	91,9	0,300	0,162	85,0	91,9	0,327	0,251	81,9	86,1
7	8	MP	0,395	0,718	80,1	63,7	0,389	0,826	80,6	58,8	0,293	0,603	83,8	66,6
7	15	MP	0,144	0,298	92,7	84,9	0,162	0,292	91,9	85,4	0,136	0,233	92,5	87,1
8	6	SP	0,140	0,342	92,9	82,7	0,135	0,350	93,3	82,5	0,124	0,274	93,1	84,8
8	39	SP	0,131	0,255	93,4	87,1	0,120	0,265	94,0	86,8	0,102	0,182	94,3	89,9
9	1	SP	0,127	0,336	93,6	83,0	0,129	0,369	93,6	81,6	0,116	0,266	93,6	85,3
9	3	SP	0,129	0,376	93,5	81,0	0,122	0,388	93,9	80,6	0,099	0,225	94,5	87,5
10	20	SP	0,150	0,128	92,4	93,5	0,179	0,194	91,1	90,3	0,163	0,127	91,0	93,0
10	23	SP	0,151	0,132	92,4	93,3	0,144	0,132	92,8	93,4	0,149	0,118	91,7	93,5
11	5	WP	0,419	0,885	78,8	55,3	0,409	1,017	79,6	49,2	0,113	0,165	93,7	90,9
11	27	WP	0,357	0,657	82,0	66,8	0,309	0,689	84,6	65,6	0,323	0,622	82,1	65,5
12	18	MP	0,141	0,319	92,9	83,9	0,177	0,318	91,2	84,1	0,165	0,244	90,9	86,5
12	30	MP	0,310	0,578	84,3	70,8	0,253	0,458	87,4	77,1	0,138	0,284	92,3	84,3
13	10	MP	0,387	0,730	80,5	63,1	0,366	0,631	81,7	68,5	0,398	0,541	77,9	70,0
13	38	MP	0,253	0,511	87,2	74,2	0,273	0,590	86,4	70,6	0,276	0,499	84,7	72,3
14	12	WP	0,355	0,741	82,1	62,6	0,448	0,630	77,6	68,6	0,384	0,569	78,7	68,5
14	36	WP	0,183	0,353	90,8	82,2	0,114	0,428	94,3	78,6	0,087	0,121	95,2	93,3
15	2	NEG	1,208	1,579	39,0	20,3	1,159	1,645	42,2	17,9	0,160	0,298	91,1	83,5
15	19	NEG	0,644	1,235	67,5	37,6	0,850	1,390	57,6	30,6	1,202	1,327	33,4	26,4
16	22	NEG	0,693	1,233	65,0	37,7	0,638	1,424	68,2	28,9	0,804	1,312	55,4	27,3
16	29	NEG	1,677	1,817	15,3	8,2	1,718	1,888	14,3	5,8	1,538	1,701	14,7	5,7
17	31	NEG	1,620	1,873	18,2	5,4	1,680	1,877	16,1	6,3	0,614	0,809	66,0	55,1
17	37	NEG	0,529	1,075	73,3	45,7	0,627	1,316	68,7	34,3	0,710	0,949	60,6	47,4
18	25	NEG	1,099	1,516	44,5	23,4	0,893	1,407	55,4	29,8	1,423	1,666	21,1	7,6
18	34	NEG	0,988	1,395	50,1	29,5	0,856	1,476	57,3	26,3	0,963	1,119	46,6	38,0
19	7	NEG	1,288	1,583	34,9	20,1	1,322	1,824	34,0	9,0	1,131	1,641	37,3	9,0
19	13	NEG	1,462	1,786	26,2	9,8	1,566	1,698	21,8	15,2	1,691	1,731	6,3	4,0
20	24	NEG	0,605	1,160	69,4	41,4	0,552	1,026	72,4	48,8	0,336	0,745	81,4	58,7
20	28	NEG	1,340	1,720	32,3	13,1	1,490	1,766	25,6	11,9	1,516	1,790	16,0	0,8

LABORATORIO 8			PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
			1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10		
1	4	SP	0,120	0,155	93,9	92,2	0,124	0,178	93,8	91,1	0,099	0,139	94,5	92,3

APPENDICE II

1	40	SP	0,125	0,109	93,7	94,5	0,137	0,217	93,2	89,2	0,105	0,161	94,2	91,1
2	9	SP	0,143	0,370	92,8	81,3	0,130	0,397	93,5	80,2	0,108	0,241	94,0	86,6
2	11	SP	0,136	0,274	93,1	86,2	0,133	0,230	93,4	88,5	0,122	0,203	93,2	88,7
3	26	SP	0,173	0,296	91,3	85,1	0,152	0,293	92,4	85,4	0,143	0,242	92,1	86,6
3	33	SP	0,158	0,263	92,0	86,7	0,141	0,266	93,0	86,7	0,092	0,106	94,9	94,1
4	17	SP	0,077	0,091	96,1	95,4	0,093	0,090	95,4	95,5	0,087	0,077	95,2	95,7
4	21	SP	0,072	0,089	96,4	95,5	0,071	0,088	96,5	95,6	0,075	0,086	95,8	95,2
5	16	MP	0,278	0,447	86,0	77,4	0,414	0,497	79,3	75,2	0,305	0,455	83,1	74,8
5	35	MP	0,345	0,462	82,6	76,7	0,437	0,409	78,2	79,6	0,371	0,411	79,4	77,2
6	14	MP	0,326	0,154	83,5	92,2	0,329	0,175	83,6	91,3	0,355	0,152	80,3	91,6
6	32	MP	0,349	0,160	82,4	91,9	0,300	0,162	85,0	91,9	0,327	0,251	81,9	86,1
7	8	MP	0,395	0,718	80,1	63,7	0,389	0,826	80,6	58,8	0,293	0,603	83,8	66,6
7	15	MP	0,144	0,298	92,7	84,9	0,162	0,292	91,9	85,4	0,136	0,233	92,5	87,1
8	6	SP	0,140	0,342	92,9	82,7	0,135	0,350	93,3	82,5	0,124	0,274	93,1	84,8
8	39	SP	0,131	0,255	93,4	87,1	0,120	0,265	94,0	86,8	0,102	0,182	94,3	89,9
9	1	SP	0,127	0,336	93,6	83,0	0,129	0,369	93,6	81,6	0,116	0,266	93,6	85,3
9	3	SP	0,129	0,376	93,5	81,0	0,122	0,388	93,9	80,6	0,099	0,225	94,5	87,5
10	20	SP	0,150	0,128	92,4	93,5	0,179	0,194	91,1	90,3	0,163	0,127	91,0	93,0
10	23	SP	0,151	0,132	92,4	93,3	0,144	0,132	92,8	93,4	0,149	0,118	91,7	93,5
11	5	WP	0,419	0,885	78,8	55,3	0,409	1,017	79,6	49,2	0,113	0,165	93,7	90,9
11	27	WP	0,357	0,657	82,0	66,8	0,309	0,689	84,6	65,6	0,323	0,622	82,1	65,5
12	18	MP	0,141	0,319	92,9	83,9	0,177	0,318	91,2	84,1	0,165	0,244	90,9	86,5
12	30	MP	0,310	0,578	84,3	70,8	0,253	0,458	87,4	77,1	0,138	0,284	92,3	84,3
13	10	MP	0,387	0,730	80,5	63,1	0,366	0,631	81,7	68,5	0,398	0,541	77,9	70,0
13	38	MP	0,253	0,511	87,2	74,2	0,273	0,590	86,4	70,6	0,276	0,499	84,7	72,3
14	12	WP	0,355	0,741	82,1	62,6	0,448	0,630	77,6	68,6	0,384	0,569	78,7	68,5
14	36	WP	0,183	0,353	90,8	82,2	0,114	0,428	94,3	78,6	0,087	0,121	95,2	93,3
15	2	NEG	1,208	1,579	39,0	20,3	1,159	1,645	42,2	17,9	0,160	0,298	91,1	83,5
15	19	NEG	0,644	1,235	67,5	37,6	0,850	1,390	57,6	30,6	1,202	1,327	33,4	26,4
16	22	NEG	0,693	1,233	65,0	37,7	0,638	1,424	68,2	28,9	0,804	1,312	55,4	27,3
16	29	NEG	1,677	1,817	15,3	8,2	1,718	1,888	14,3	5,8	1,538	1,701	14,7	5,7
17	31	NEG	1,620	1,873	18,2	5,4	1,680	1,877	16,1	6,3	0,614	0,809	66,0	55,1
17	37	NEG	0,529	1,075	73,3	45,7	0,627	1,316	68,7	34,3	0,710	0,949	60,6	47,4
18	25	NEG	1,099	1,516	44,5	23,4	0,893	1,407	55,4	29,8	1,423	1,666	21,1	7,6
18	34	NEG	0,988	1,395	50,1	29,5	0,856	1,476	57,3	26,3	0,963	1,119	46,6	38,0
19	7	NEG	1,288	1,583	34,9	20,1	1,322	1,824	34,0	9,0	1,131	1,641	37,3	9,0
19	13	NEG	1,462	1,786	26,2	9,8	1,566	1,698	21,8	15,2	1,691	1,731	6,3	4,0
20	24	NEG	0,605	1,160	69,4	41,4	0,552	1,026	72,4	48,8	0,336	0,745	81,4	58,7
20	28	NEG	1,340	1,720	32,3	13,1	1,490	1,766	25,6	11,9	1,516	1,790	16,0	0,8

LABORATORIO 9			prova 1				prova 2				prova 3			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
			1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	SP	0,084	0,120	95,1	92,9	0,110	0,133	94,7	93,6	0,099	0,141	95,0	92,8
1	40	SP	0,082	0,114	95,2	93,3	0,103	0,142	95,0	93,1	0,092	0,131	95,3	93,3

APPENDICE II

2	9	SP	0,228	0,343	86,6	79,8	0,131	0,128	93,7	93,8	0,112	0,213	94,3	89,2
2	11	SP	0,210	0,205	87,6	87,9	0,136	0,131	93,4	93,7	0,112	0,222	94,3	88,7
3	26	SP	0,172	0,303	89,9	82,2	0,273	0,495	86,8	76,1	0,200	0,371	89,8	81,2
3	33	SP	0,193	0,304	88,6	82,1	0,284	0,450	86,3	78,3	0,240	0,418	87,8	78,8
4	17	SP	0,082	0,081	95,2	95,2	0,096	0,093	95,4	95,5	0,093	0,121	95,3	93,9
4	21	SP	0,080	0,085	95,3	95,0	0,098	0,098	95,3	95,3	0,095	0,100	95,2	94,9
5	16	MP	0,246	0,266	85,5	84,4	0,334	0,438	83,9	78,8	0,351	0,491	82,2	75,1
5	35	MP	0,255	0,267	85,0	84,3	0,353	0,404	82,9	80,5	0,290	0,520	85,3	73,6
6	14	MP	0,268	0,141	84,2	91,7	0,295	0,197	85,7	90,5	0,057	0,182	97,1	90,8
6	32	MP	0,154	0,139	90,9	91,8	0,284	0,183	86,3	91,2	0,343	0,153	82,6	92,2
7	8	MP	0,232	0,374	86,4	78,0	0,410	0,645	80,2	68,8	0,291	0,557	85,2	71,7
7	15	MP	0,290	0,414	82,9	75,6	0,415	0,687	79,9	66,8	0,385	0,708	80,4	64,0
8	6	SP	0,118	0,249	93,1	85,4	0,188	0,398	90,9	80,8	0,184	0,385	90,7	80,4
8	39	SP	0,125	0,259	92,6	84,8	0,168	0,351	91,9	83,0	0,157	0,319	92,0	83,8
9	1	SP	0,090	0,194	94,7	88,6	0,128	0,281	93,8	86,4	0,131	0,356	93,3	81,9
9	3	SP	0,095	0,235	94,4	86,2	0,133	0,285	93,6	86,2	0,122	0,403	93,8	79,5
10	20	SP	0,110	0,105	93,5	93,8	0,215	0,118	89,6	94,3	0,217	0,116	89,0	94,1
10	23	SP	0,170	0,103	90,0	93,9	0,222	0,122	89,3	94,1	0,196	0,117	90,0	94,1
11	5	WP	0,402	0,652	76,4	61,6	0,561	0,867	72,9	58,1	0,551	0,896	72,0	54,5
11	27	WP	0,359	0,613	78,9	63,9	0,598	0,967	71,1	53,3	0,480	0,762	75,6	61,3
12	18	MP	0,214	0,417	87,4	75,5	0,334	0,602	83,9	70,9	0,298	0,504	84,9	74,4
12	30	MP	0,192	0,342	88,7	79,9	0,328	0,520	84,2	74,9	0,238	0,437	87,9	77,8
13	10	MP	0,342	0,657	79,88	61,35	0,366	0,633	82,31	69,42	0,397	0,695	79,8	64,7
13	38	MP	0,358	0,637	78,94	62,53	0,356	0,654	82,8	68,4	0,342	0,592	82,6	69,9
14	12	WP	0,392	0,701	76,9	58,8	0,503	0,830	75,7	59,9	0,421	0,703	78,6	64,3
14	36	WP	0,421	0,839	75,2	50,6	0,476	0,902	77,0	56,4	0,371	0,650	81,2	67,0
15	2	NEG	1,241	1,353	27,0	20,4	1,649	1,736	20,3	16,1	1,402	1,759	28,8	10,7
15	19	NEG	1,278	1,580	24,8	7,1	1,394	1,576	32,6	23,9	1,514	1,849	23,1	6,1
16	22	NEG	0,983	1,330	42,2	21,8	1,511	1,682	27,0	18,7	1,525	1,739	22,6	11,7
16	29	NEG	0,924	1,445	45,6	15,0	1,711	1,998	17,3	3,5	1,568	1,778	20,4	9,7
17	31	NEG	0,902	1,400	46,9	17,6	1,717	2,003	17,0	3,2	1,536	1,746	22,0	11,3
17	37	NEG	1,053	1,330	38,1	21,8	1,798	2,044	13,1	1,2	1,598	1,833	18,9	6,9
18	25	NEG	0,444	0,777	73,9	54,3	1,451	1,811	29,9	12,5	1,523	1,877	22,7	4,7
18	34	NEG	1,121	1,246	34,1	26,7	1,525	1,786	26,3	13,7	1,474	1,767	25,1	10,3
19	7	NEG	0,984	1,297	42,1	23,7	1,793	1,907	13,4	7,9	1,687	2,020	14,3	-2,6
19	13	NEG	1,092	1,460	35,8	14,1	1,577	1,769	23,8	14,5	1,508	1,755	23,4	10,9
20	24	NEG	1,469	1,534	13,6	9,8	1,528	1,659	26,2	19,8	1,235	1,640	37,3	16,7
20	28	NEG	1,065	1,073	37,4	36,9	1,810	2,096	12,5	-1,3	1,515	1,705	23,1	13,4

APPENDICE III

Valori di OD e PI dei controlli positivi, negativi e di reazione per ogni laboratorio e per ogni singola prova

CR	PROVA 1	PROVA 2	PROVA 3
	DO	DO	DO

APPENDICE II

LAB 1	2,020	2,179	2,122	2,098	2,337	2,285
	2,071	2,086	2,110	2,116	2,291	2,326
LAB 2	0,254	0,257	0,278	0,354	0,374	0,421
	0,267	0,259	0,364	0,340	0,411	0,467
LAB 3	1,466	1,500	1,410	1,360	1,811	1,702
	1,572	1,545	1,471	1,606	1,792	1,789
LAB 4	0,801	0,812	1,481	1,407	0,751	0,755
	0,797	0,850	1,397	1,532	0,780	0,931
LAB 5	1,913	1,922	1,557	1,518	1,806	1,743
	2,005	1,990	1,564	1,699	1,723	1,769
LAB 6	1,461	1,384	1,403	1,476	1,415	1,357
	1,453	1,308	1,485	1,883	1,393	1,247
LAB 7	1,978	1,982	1,988	2,003	1,777	1,770
	1,962	1,998	1,999	2,024	1,845	1,823
LAB 8	1,426	1,453	1,462	1,462	1,356	1,398
	1,459	1,604	1,512	1,604	1,375	1,526
LAB 9	1,694	1,684	2,046	2,084	1,985	2,046

K+		PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
		DO	PI	DO	PI	DO	PI
LAB 1	1:5	0,056	97,32	0,051	97,58	0,059	97,45
	1:10	0,058	97,22	0,052	97,54	0,086	96,28
LAB 2	1:5	0,040	84,57	0,036	89,22	0,038	90,91
	1:10	0,041	84,19	0,038	88,62	0,040	90,43
LAB 3	1:5	0,119	92,17	0,244	83,31	0,102	94,25
	1:10	0,068	95,53	0,067	95,42	0,088	95,04
LAB 4	1:5	0,057	93,01	0,063	95,67	0,108	86,57
	1:10	0,059	92,76	0,060	95,87	0,053	93,41
LAB 5	1:5	0,040	97,96	0,039	97,54	0,041	97,67
	1:10	0,035	98,21	0,036	97,73	0,035	98,01
LAB 6	1:5	0,056	96,00	0,061	96,09	0,077	94,31
	1:10	0,058	95,86	0,061	96,09	0,070	94,83
LAB 7	1:5	0,052	97,37	0,051	97,45	0,049	97,28
	1:10	0,052	97,37	0,052	97,40	0,050	97,23
LAB 8	1:5	0,047	96,84	0,003	98,01	0,002	98,59
	1:10	0,051	96,57	0,009	99,40	0,009	93,63
LAB 9	1:5	0,054	96,82	0,085	95,89	0,068	96,55
	1:10	0,049	97,12	0,078	96,23	0,068	96,55

K-		PROVA 1		PROVA 2		PROVA 3	
		DO	PI	DO	PI	DO	PI
LAB 1	1:5	1,799	13,88	1,801	14,71	1,756	23,97
	1:10	2,172	-3,97	1,962	7,08	2,100	9,08
LAB 2	1:5	0,237	8,58	0,376	-12,57	0,380	9,09
	1:10	0,348	-34,23	0,413	-23,65	0,398	4,78
LAB 3	1:5	1,297	14,71	1,238	15,31	1,182	33,35
	1:10	1,245	18,13	0,995	31,93	1,485	16,27
LAB 4	1:5	0,779	4,42	1,365	6,14	0,860	-6,93

APPENDICE II

	1:10	0,996	-22,21	1,429	1,74	0,896	-11,41
LAB 5	1:5	1,300	33,59	0,965	39,10	0,724	58,87
	1:10	1,855	5,24	1,211	23,57	1,058	39,89
LAB 6	1:5	1,272	9,24	1,409	9,78	1,215	10,20
	1:10	1,267	9,60	1,399	10,42	1,108	18,11
LAB 7	1:5	1,741	12,07	1,832	8,56	1,607	10,91
	1:10	1,804	8,89	1,935	3,42	1,732	3,98
LAB 8	1:5	0,656	55,84	0,633	58,08	0,582	58,83
	1:10	0,980	34,03	1,006	33,38	0,958	32,24
LAB 9	1:5	0,971	42,88	1,273	38,49	0,582	48,86
	1:10	1,089	35,94	1,550	25,11	0,958	32,41

APPENDICE IV**Valori di CV (Coefficiente di Variazione)**

CV per ogni coppia di sieri analizzati in doppio e per ogni laboratorio

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	LAB 1												
			PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3				
			DO		PI		DO		PI		DO		PI		
			1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	
1	4	40	SP	12,4	30,9	0,5	1,7	4,6	13,3	0,2	0,9	15,1	8,0	0,5	0,5
2	9	11	SP	17,2	55,1	0,7	5,7	5,0	4,1	0,3	0,8	9,0	10,0	0,5	2,4

APPENDICE II

3	26	33	SP	8,4	3,4	0,8	11,3	5,5	39,0	0,7	9,2	4,9	24,4	0,6	6,8
4	17	21	SP	7,6	13,3	0,2	0,5	11,9	12,0	0,4	0,6	9,6	102,1	0,3	2,6
5	16	35	MP	1,4	1,8	0,1	0,4	2,6	0,3	0,4	0,0	11,5	7,7	1,2	1,5
6	14	32	MP	14,5	6,1	2,1	0,4	6,6	63,1	0,7	9,3	12,8	3,3	1,6	0,2
7	8	15	MP	2,1	31,6	0,3	13,7	10,2	3,1	2,5	1,9	6,0	0,4	1,4	0,3
8	6	39	SP	15,7	4,1	0,8	0,5	16,1	10,0	1,2	1,7	6,7	4,9	0,5	1,0
9	1	3	SP	4,7	68,6	0,2	6,5	21,5	3,2	1,5	0,6	106,4	8,1	2,7	1,8
10	20	23	SP	22,2	48,7	2,7	3,8	14,6	3,0	0,8	0,1	21,5	0,0	1,5	0,0
11	5	27	WP	6,2	33,0	1,0	20,1	5,5	10,7	1,5	8,0	23,2	10,9	5,7	9,3
12	18	30	MP	21,2	11,8	2,0	2,5	21,4	4,8	3,3	1,9	42,5	3,2	6,4	1,2
13	10	38	MP	4,1	6,6	0,7	2,5	0,0	0,5	0,0	0,3	4,3	7,0	0,9	4,1
14	12	36	WP	1,0	10,6	0,2	5,1	7,5	4,8	2,1	3,4	11,0	3,7	2,7	2,6
15	2	19	N	0,4	1,5	1,5	14,0	4,2	5,8	22,4	53,4	6,2	3,3	15,4	40,0
16	22	29	N	10,9	24,4	40,4	84,4	0,8	1,3	6,0	31,4	4,9	2,9	11,6	29,4
17	31	37	N	4,0	3,7	22,0	69,0	2,2	8,3	17,3	-2063,1	0,6	1,7	1,7	15,0
18	25	34	N	0,9	7,2	5,0	-971,7	4,3	2,0	25,4	42,1	12,1	2,6	26,7	44,6
19	7	13	N	1,0	0,7	4,1	8,1	5,7	5,6	28,0	84,7	0,6	1,0	1,0	9,4
20	24	28	N	2,0	8,6	6,9	266,6	2,5	1,8	10,9	44,0	3,7	4,5	8,1	42,1

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	LAB 3											
				PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
				DO		PI		DO		PI		DO		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	35,2	42,7	4,2	5,3	95,6	8,2	23,7	0,6	6,8	3,3	0,6	0,4
2	9	11	SP	13,8	7,4	1,1	0,5	1,3	7,3	0,1	0,5	0,4	19,7	0,0	3,4
3	26	33	SP	22,6	38,0	2,5	3,5	16,4	30,6	1,8	2,7	12,9	8,4	1,8	2,0
4	17	21	SP	3,4	9,9	0,2	0,5	3,6	1,9	0,2	0,1	3,3	0,7	0,2	0,0
5	16	35	MP	1,8	4,4	0,2	0,4	0,5	24,0	0,1	2,0	11,0	16,9	2,7	5,3
6	14	32	MP	22,3	17,2	5,3	1,5	3,5	3,2	0,4	0,3	7,3	1,2	2,1	0,2
7	8	15	MP	17,4	6,4	3,4	0,7	61,1	15,9	15,4	1,7	18,6	28,6	5,8	13,3
8	6	39	SP	2,9	14,1	0,2	1,0	8,0	0,0	0,6	0,0	4,4	8,4	0,4	1,5
9	1	3	SP	45,0	41,2	5,8	4,8	6,7	11,6	0,5	0,9	6,6	5,8	0,8	1,3

APPENDICE II

10	20	23	SP	19,2	2,6	5,4	0,4	3,3	4,9	0,8	0,5	14,7	15,6	2,0	1,6
11	5	27	WP	32,0	24,6	6,8	2,9	30,6	11,1	5,0	1,2	0,0	2,3	0,0	1,4
12	18	30	MP	41,1	45,9	6,6	5,2	25,5	13,3	2,9	0,9	18,3	48,0	3,1	10,6
13	10	38	MP	50,1	37,2	12,5	5,0	31,2	7,1	6,8	0,7	25,1	18,8	9,5	7,8
14	12	36	WP	19,4	9,6	5,1	1,0	3,2	5,2	0,7	0,6	4,9	20,3	1,9	14,7
15	2	19	N	4,1	6,4	29,2	16,3	2,4	9,0	13,5	14,0	2,6	5,0	18,4	68,1
16	22	29	N	5,4	10,5	42,8	20,6	5,9	17,3	46,9	28,9	0,1	0,3	0,7	2,5
17	31	37	N	3,4	8,1	19,4	13,6	4,4	5,0	27,1	12,2	2,2	12,8	17,5	104,0
18	25	34	N	2,6	2,7	17,3	5,3	7,4	8,2	53,6	18,4	0,7	9,0	4,4	68,3
19	7	13	N	18,6	7,7	137,0	23,4	4,4	6,4	23,5	15,0	2,2	7,8	23,5	99,4
20	24	28	N	4,6	5,4	34,1	9,4	16,1	3,4	103,0	4,4	8,7	2,5	130,6	14,4

LAB 4							
PROVA 2							
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	DO		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	2,8	1,3	0,3	0,2
2	9	11	SP	10,8	18,5	1,2	5,6
3	26	33	SP	14,4	8,8	2,6	2,4
4	17	21	SP	8,2	2,6	0,6	0,2
5	16	35	MP	4,1	1,6	1,2	0,8
6	14	32	MP	4,3	0,3	1,4	0,1
7	8	15	MP	16,4	23,8	3,7	10,3
8	6	39	SP	3,6	23,7	0,4	5,5
9	1	3	SP	8,8	6,0	1,0	1,8
10	20	23	SP	2,0	2,7	0,3	0,3
11	5	27	WP	20,6	5,6	8,0	4,3

APPENDICE II

12	18	30	MP	9,6	10,0	2,2	4,5
13	10	38	MP	13,0	3,3	4,3	1,9
14	12	36	WP	12,5	17,8	5,0	14,9
15	2	19	N	1,5	0,5	-39,4	-5,6
16	22	29	N	0,1	1,1	-0,9	-10,6
17	31	37	N	3,0	4,7	-43,3	-49,4
18	25	34	N	1,8	11,4	-197,5	-1489,6
19	7	13	N	0,5	5,8	-28,5	-59,7
20	24	28	N	3,6	0,4	-66,3	-5,2

SIERO DI PARTENZA			SIERO DEL PANNELLO			RISULTATO ATTESO			LAB 5											
									PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
									DO		PI		DO		PI		DO		PI	
									1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	17,2	18,0	1,2	55,9	31,4	28,9	2,3	1,7	14,5	10,6	0,8	0,6					
2	9	11	SP	8,8	13,7	0,6	1,8	14,5	30,3	0,9	3,0	0,5	33,8	0,0	3,5					
3	26	33	SP	7,4	39,6	0,8	9,4	13,4	7,4	0,9	0,8	2,4	5,5	0,2	0,6					
4	17	21	SP	10,7	15,9	0,4	0,8	16,0	4,6	0,7	0,2	2,1	1,9	0,1	0,1					
5	16	35	MP	14,0	10,2	2,4	1,2	6,8	15,3	1,1	2,7	6,6	20,9	0,8	2,2					
6	14	32	MP	11,8	4,8	1,4	0,3	4,9	19,6	0,8	2,0	0,0	14,2	0,0	0,9					
7	8	15	MP	6,1	6,4	1,5	3,4	6,0	54,4	0,7	7,3	2,6	2,0	0,5	0,6					
8	6	39	SP	3,7	34,3	0,3	6,1	14,6	0,6	0,8	0,0	14,0	0,9	1,0	0,1					
9	1	3	SP	6,7	45,3	0,4	5,5	15,1	58,1	0,7	5,7	34,2	59,0	2,5	6,4					
10	20	23	SP	14,5	39,7	1,0	1,9	0,4	2,0	0,0	0,1	2,2	4,8	0,1	0,3					
11	5	27	WP	14,7	0,6	3,8	0,4	8,8	5,9	1,3	1,8	22,0	6,8	3,8	1,8					
12	18	30	MP	3,0	5,0	0,4	1,4	9,0	1,8	0,8	0,3	10,6	11,8	1,0	1,7					
13	10	38	MP	7,8	7,9	2,0	4,7	0,7	21,5	0,1	4,9	9,4	0,8	1,5	0,2					
14	12	36	WP	15,4	12,1	4,7	8,9	31,9	39,3	4,2	9,8	25,0	12,0	4,8	3,8					
15	2	19	N	9,0	9,5	237,4	-181,0	13,4	19,8	19,6	18,2	9,7	10,3	12,0	20,1					
16	22	29	N	13,6	2,6	149,7	-45,0	6,2	2,6	11,9	5,8	7,0	14,5	8,7	18,0					
17	31	37	N	24,5	9,0	1405,8	-84,2	4,9	2,3	11,3	8,6	6,0	9,0	6,9	22,6					
18	25	34	N	3,3	6,5	20,9	-133,6	2,5	4,2	3,6	9,6	2,4	17,7	2,8	30,1					
19	7	13	N	12,0	3,7	154,0	231,8	35,9	31,5	29,4	47,4	9,7	7,2	12,1	12,3					
20	24	28	N	0,7	3,2	4,1	449,5	2,9	3,3	5,4	9,3	0,9	3,8	1,1	4,6					

SIERO DI PARTENZA			SIERO DEL PANNELLO			RISULTATO ATTESO			LAB 6											
									PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
									DO		PI		DO		PI		DO		PI	
									1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	5,7	14,6	0,4	1,6	5,2	64,7	0,3	7,0	16,6	7,1	1,1	0,6					
2	9	11	SP	9,2	3,3	0,8	0,5	9,1	5,8	0,6	0,6	51,5	54,2	9,3	6,6					
3	26	33	SP	14,0	13,3	1,3	2,5	12,6	13,7	1,2	2,6	55,0	83,8	8,1	18,3					
4	17	21	SP	13,7	3,5	0,7	0,2	12,5	2,7	0,6	0,1	27,1	40,5	1,5	2,7					
5	16	35	MP	3,6	5,0	0,9	2,4	9,8	3,2	1,3	1,1	93,2	29,6	37,0	16,8					
6	14	32	MP	5,2	65,7	1,9	21,2	22,2	2,6	6,3	0,4	5,6	23,9	0,9	5,2					
7	8	15	MP	24,9	23,1	5,0	8,9	16,1	21,5	2,6	6,6	76,1	15,8	9,5	9,4					
8	6	39	SP	6,1	9,7	0,6	1,6	11,1	62,9	0,9	11,2	22,9	19,7	22,1	2,8					
9	1	3	SP	4,6	6,6	0,3	1,6	9,0	11,1	0,6	0,9	21,1	24,8	1,5	3,5					
10	20	23	SP	12,6	6,4	2,7	0,7	7,9	4,7	2,7	0,4	6,1	2,6	1,0	0,3					
11	5	27	WP	15,9	4,2	4,6	3,2	11,3	2,5	2,6	1,2	66,0	0,6	8,7	0,1					
12	18	30	MP	7,3	7,0	0,8	1,9	4,7	7,6	0,4	1,1	13,3	18,8	3,1	6,8					
13	10	38	MP	11,3	22,0	2,5	11,8	17,0	12,6	3,1	3,5	59,7	10,6	19,3	3,1					

APPENDICE II

14	12	36	WP	2,0	3,8	0,6	2,5	9,5	7,2	1,9	2,8	38,9	36,4	20,6	39,1
15	2	19	N	0,2	1,0	2,9	-9,7	1,7	0,4	7,4	2,8	17,9	24,0	-134,6	-110,0
16	22	29	N	1,0	5,5	28,0	-66,8	11,0	5,2	29,8	23,3	59,2	40,4	409,4	-513,6
17	31	37	N	4,2	1,7	366,8	-19,2	20,6	11,8	48,3	49,9	14,5	1,7	-94,6	-6,0
18	25	34	N	10,9	0,4	-129,9	-3,5	5,7	11,7	15,3	42,8	9,9	12,5	-42,2	-45,1
19	7	13	N	24,7	12,4	233,8	-565,7	47,4	28,7	53,1	56,8	14,1	17,3	40,1	-96,4
20	24	28	N	0,5	0,2	-19,0	-1,9	8,9	50,8	27,9	67,9	15,0	3,5	-58,2	-15,6

				LAB 7											
				PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
SIERO DI PARTENZ A	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10		
				1	4	40	SP	2,9	24,6	0,2	1,8	7,0	14,0	0,5	1,5
2	9	11	SP	3,5	21,1	0,3	4,1	1,6	37,7	0,1	7,0	8,6	12,1	0,6	1,7
3	26	33	SP	6,4	8,3	0,6	1,4	5,3	6,8	0,4	1,1	30,7	55,3	2,1	5,9
4	17	21	SP	4,7	1,6	0,2	0,1	19,0	1,6	0,8	0,1	10,5	7,8	0,5	0,4
5	16	35	MP	15,2	2,3	2,8	0,7	3,8	13,7	1,0	4,0	13,8	7,2	3,2	2,3
6	14	32	MP	4,8	2,7	1,0	0,2	6,5	5,5	1,2	0,5	5,8	34,7	1,4	4,4
7	8	15	MP	65,9	58,5	10,4	20,2	58,3	67,5	9,3	26,1	51,8	62,6	7,0	18,9
8	6	39	SP	4,7	20,6	0,3	3,7	8,3	19,5	0,6	3,5	13,8	28,5	0,9	4,1
9	1	3	SP	1,1	7,9	0,1	1,7	3,9	3,5	0,3	0,8	11,2	11,8	0,7	1,9
10	20	23	SP	0,5	2,2	0,0	0,2	15,3	26,9	1,3	2,4	6,3	5,2	0,6	0,4
11	5	27	WP	11,3	20,9	2,8	13,3	19,7	27,2	4,3	20,2	68,1	82,1	9,4	22,9
12	18	30	MP	53,0	40,8	6,8	12,0	25,0	25,5	3,0	6,1	12,6	10,7	1,2	1,8
13	10	38	MP	29,6	25,0	5,7	11,4	20,6	4,7	3,9	2,1	25,6	5,7	5,9	2,3
14	12	36	WP	45,2	50,2	7,1	19,1	84,0	27,0	13,7	9,7	89,2	91,8	13,4	21,7
15	2	19	N	43,1	17,3	37,8	42,5	21,8	11,9	21,9	37,1	108,2	89,6	65,6	73,4
16	22	29	N	58,7	27,1	87,5	90,8	64,8	19,8	92,5	94,4	44,3	18,3	82,0	92,5
17	31	37	N	71,8	38,3	85,2	111,5	64,5	24,8	87,6	97,5	10,3	11,3	5,9	10,7
18	25	34	N	7,5	5,9	8,4	16,3	3,0	3,4	2,3	8,7	27,3	27,8	53,3	94,1
19	7	13	N	8,9	8,5	20,3	48,6	11,9	5,1	30,8	36,7	28,1	3,8	100,8	54,0
20	24	28	N	53,4	27,5	51,6	73,3	65,0	37,5	67,5	86,1	90,1	58,3	95,1	137,8

				LAB 8											
				PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	DO		PI		DO		PI		DO		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10		
				1	4	40	SP	3,2	3,0	0,1	0,2	0,0	7,3	0,0	0,2
2	9	11	SP	10,9	9,4	0,6	1,2	29,5	3,3	0,5	0,4	5,2	21,1	0,1	2,6
3	26	33	SP	25,6	29,1	1,6	3,0	2,6	3,6	0,2	0,5	1,0	16,9	0,1	1,9
4	17	21	SP	2,7	5,0	0,1	0,2	3,6	8,5	0,0	0,2	2,9	13,5	0,1	0,2
5	16	35	MP	5,1	6,9	0,6	1,6	5,4	14,3	0,4	3,5	13,3	19,1	1,6	5,1
6	14	32	MP	5,3	0,0	0,6	0,0	12,4	0,6	1,1	0,1	19,0	10,8	1,9	1,0
7	8	15	MP	30,1	5,3	3,5	1,5	5,0	10,7	0,6	3,8	27,0	8,9	3,3	2,4
8	6	39	SP	15,7	32,2	0,8	3,2	30,7	36,2	1,2	5,5	32,6	64,2	0,8	7,7
9	1	3	SP	2,2	5,9	0,1	0,5	18,7	6,5	0,5	1,2	40,9	3,0	0,7	0,3
10	20	23	SP	9,0	6,3	0,8	0,5	0,7	7,6	0,1	0,4	8,5	12,9	0,7	0,6
11	5	27	WP	23,4	31,4	3,1	11,1	15,0	30,2	3,4	17,8	18,7	35,2	2,8	14,9
12	18	30	MP	5,3	0,0	0,4	0,0	1,1	4,2	0,1	0,9	26,4	15,6	2,2	2,4
13	10	38	MP	36,0	28,7	4,4	7,0	2,1	7,7	0,3	2,9	3,4	6,9	0,3	1,9
14	12	36	WP	0,0	18,7	0,0	5,8	17,6	9,0	3,4	4,6	4,8	4,2	0,6	1,6
15	2	19	N	15,6	5,1	16,0	7,0	7,3	4,3	10,2	9,8	14,9	5,2	17,3	10,4

APPENDICE II

16	22	29	N	0,9	2,8	1,0	3,6	7,3	9,1	11,1	23,0	14,6	5,3	15,0	9,2
17	31	37	N	2,1	9,1	1,9	13,8	4,4	0,9	5,8	2,0	6,1	6,4	6,8	12,1
18	25	34	N	21,1	26,1	27,5	57,5	18,1	13,7	40,6	63,3	23,0	16,1	29,2	41,2
19	7	13	N	6,5	6,0	6,7	23,0	7,3	9,6	10,3	34,4	8,4	9,6	8,6	25,5
20	24	28	N	2,6	7,9	2,8	12,9	4,2	8,7	6,7	20,3	12,9	5,8	13,7	11,2

				LAB 9											
				PROVA 1				PROVA 2				PROVA 3			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO		DO		PI		DO		PI		DO		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10	1:5	1:10		
1	4	40	SP	1,7	3,6	0,1	0,3	4,6	4,6	0,3	0,3	5,2	5,2	0,3	0,4
2	9	11	SP	5,8	35,6	0,9	6,8	2,6	1,6	0,2	0,1	0,0	2,9	0,0	0,4
3	26	33	SP	8,1	0,2	1,0	0,1	2,8	6,7	0,4	2,0	12,9	8,4	1,6	2,1
4	17	21	SP	1,7	3,4	0,1	0,2	1,5	3,7	0,1	0,2	1,5	13,4	0,1	0,8
5	16	35	MP	2,5	0,3	0,4	0,0	3,9	5,7	0,8	1,5	13,5	4,1	2,6	1,4
6	14	32	MP	38,2	1,0	5,4	0,1	2,7	5,2	0,4	0,5	101,1	12,2	11,4	1,1
7	8	15	MP	15,7	7,2	2,9	2,2	0,9	4,5	0,2	2,1	19,7	16,9	4,1	8,0
8	6	39	SP	4,1	2,8	0,3	0,5	7,9	8,9	0,7	2,0	11,2	13,3	1,1	2,9
9	1	3	SP	3,8	13,5	0,2	2,0	2,7	1,0	0,2	0,2	5,0	8,8	0,3	2,1
10	20	23	SP	30,3	1,4	2,7	0,1	2,3	2,4	0,3	0,1	7,2	0,6	0,8	0,0
11	5	27	WP	8,0	4,4	2,3	2,6	4,5	7,7	1,8	6,1	9,7	11,4	3,5	8,3
12	18	30	MP	7,7	14,0	1,0	4,0	1,3	10,3	0,2	3,8	15,8	10,1	2,5	3,2
13	10	38	MP	3,2	2,2	0,8	1,3	2,0	2,3	0,4	1,0	10,5	11,3	2,4	5,5
14	12	36	WP	5,0	12,7	1,6	10,5	3,9	5,9	1,2	4,2	8,9	5,5	2,2	2,9
15	2	19	N	2,1	10,9	5,9	68,7	11,9	6,8	32,9	27,3	5,4	3,5	15,5	38,5
16	22	29	N	4,4	5,9	5,6	26,0	8,8	12,1	30,8	97,3	2,0	1,6	7,2	13,1
17	31	37	N	10,9	3,6	14,8	14,8	3,3	1,4	18,3	62,7	2,8	3,4	10,9	34,2
18	25	34	N	61,2	32,8	52,2	48,2	3,5	1,0	9,0	6,5	2,3	4,3	7,4	52,8
19	7	13	N	7,4	8,4	11,5	35,9	9,1	5,3	39,7	42,1	7,9	9,9	34,0	229,2
20	24	28	N	22,5	25,0	66,0	82,2	11,9	16,5	49,8	160,7	14,4	2,7	33,3	15,5

CV per ogni coppia di sieri analizzati in doppio per ogni laboratorio considerando

tutte le prove

				LAB 1			
SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO		DO		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	9,2	16,7	0,4	1,0
2	9	11	SP	15,2	37,7	0,7	6,1
3	26	33	SP	15,9	29,0	1,5	10,4
4	17	21	SP	7,7	42,1	0,3	1,6
5	16	35	MP	30,9	20,7	3,7	3,4
6	14	32	MP	14,0	59,4	1,8	5,5
7	8	15	MP	21,7	20,4	4,0	9,9
8	6	39	SP	19,5	26,4	1,2	3,6
9	1	3	SP	50,8	39,4	2,4	6,1
10	20	23	SP	35,9	33,9	3,1	2,1
11	5	27	WP	25,3	19,8	5,1	12,7
12	18	30	MP	34,6	24,5	4,3	7,2
13	10	38	MP	13,5	17,8	2,4	7,6
14	12	36	WP	12,7	16,1	2,8	8,2
15	2	19	N	5,9	7,0	28,2	33,0
16	22	29	N	8,9	15,3	44,7	102,2
17	31	37	N	4,3	5,2	38,6	126,9

APPENDICE II

18	25	34	N	8,2	5,0	47,1	148,4
19	7	13	N	7,8	4,4	37,9	36,3
20	24	28	N	4,4	4,7	25,7	94,8

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	LAB 3				
			DO		PI		
			1:5	1:10	1:5	1:10	
1	4	40	SP	72,9	31,9	11,8	3,1
2	9	11	SP	24,5	61,7	1,4	5,1
3	26	33	SP	24,7	58,6	2,1	6,7
4	17	21	SP	15,8	15,7	0,4	0,4
5	16	35	MP	48,4	76,3	5,8	10,0
6	14	32	MP	38,7	38,8	6,8	3,0
7	8	15	MP	37,6	81,6	8,6	14,7
8	6	39	SP	28,4	59,8	1,5	5,1
9	1	3	SP	34,5	55,5	3,4	6,4
10	20	23	SP	22,8	19,9	6,1	2,8
11	5	27	WP	42,7	81,6	8,2	17,4
12	18	30	MP	32,9	67,7	4,2	7,7
13	10	38	MP	40,8	69,3	9,6	12,2
14	12	36	WP	30,6	90,9	6,1	21,5
15	2	19	N	10,6	29,6	19,0	61,4
16	22	29	N	9,7	28,3	28,1	50,4
17	31	37	N	11,5	26,9	21,1	52,0
18	25	34	N	8,7	24,8	24,8	45,7
19	7	13	N	15,4	23,9	68,3	56,0
20	24	28	N	15,6	29,7	77,6	43,2

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO	RISULTATO ATTESO	LAB 5				
			OD		PI		
			1:5	1:10	1:5	1:10	
1	4	40	SP	22,6	30,4	1,4	25,8
2	9	11	SP	19,4	30,1	1,0	2,7
3	26	33	SP	34,9	54,0	2,2	6,8
4	17	21	SP	9,4	18,4	0,4	0,5
5	16	35	MP	22,5	19,1	2,6	3,3
6	14	32	MP	22,8	18,3	3,1	1,9
7	8	15	MP	36,1	54,4	4,9	13,8
8	6	39	SP	21,0	51,0	1,0	4,9
9	1	3	SP	28,5	44,9	1,5	4,6
10	20	23	SP	22,7	19,2	2,4	1,3
11	5	27	WP	33,9	42,2	4,9	12,9
12	18	30	MP	29,0	42,1	2,1	6,2
13	10	38	MP	32,4	46,3	4,3	12,7
14	12	36	WP	43,3	48,4	7,3	16,2
15	2	19	N	38,7	46,0	70,9	101,6
16	22	29	N	33,3	39,4	61,4	103,1
17	31	37	N	39,2	31,6	88,2	158,8
18	25	34	N	32,1	35,5	46,7	101,6
19	7	13	N	46,0	36,7	68,2	80,5
20	24	28	N	29,1	34,3	45,6	83,3

SIERO DI	SIERO DEL	RISULTATO	LAB 6			
			OD		PI	
			1:5	1:10	1:5	1:10

APPENDICE II

PARTENZA	PANNELLO		ATTESO				
1	4	40	SP	8,7	37,1	0,8	3,3
2	9	11	SP	54,0	26,3	6,3	3,7
3	26	33	SP	35,1	39,5	4,3	8,3
4	17	21	SP	14,7	19,8	0,9	1,4
5	16	35	MP	66,1	17,3	17,6	10,0
6	14	32	MP	32,0	45,0	8,1	10,9
7	8	15	MP	35,7	22,3	5,8	11,2
8	6	39	SP	12,1	37,4	11,5	5,3
9	1	3	SP	12,4	39,6	0,7	6,5
10	20	23	SP	35,0	4,3	6,7	0,9
11	5	27	WP	32,6	54,9	5,8	21,3
12	18	30	MP	34,6	27,1	5,8	8,3
13	10	38	MP	36,8	26,5	9,8	10,2
14	12	36	WP	36,2	28,8	13,5	22,4
15	2	19	N	13,5	16,0	616,9	-256,0
16	22	29	N	27,2	20,6	178,5	10322,2
17	31	37	N	19,8	18,0	551,6	-274,8
18	25	34	N	20,8	20,2	-642,2	-296,5
19	7	13	N	29,7	24,9	83,5	909,1
20	24	28	N	21,3	32,3	-625,3	3958,3

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	LAB 7			
				OD		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	11,8	22,8	0,5	1,9
2	9	11	SP	9,5	27,8	0,4	4,3
3	26	33	SP	19,3	28,9	1,4	3,8
4	17	21	SP	11,2	5,9	0,5	0,2
5	16	35	MP	17,2	7,4	3,6	2,3
6	14	32	MP	5,9	21,5	2,0	2,6
7	8	15	MP	48,1	51,1	7,0	17,1
8	6	39	SP	10,8	22,3	0,6	3,3
9	1	3	SP	9,6	20,3	0,4	3,3
10	20	23	SP	8,3	20,0	0,8	1,3
11	5	27	WP	34,6	43,3	6,5	21,7
12	18	30	MP	35,1	34,4	3,7	7,3
13	10	38	MP	20,0	14,9	4,4	5,5
14	12	36	WP	58,4	46,8	9,2	14,9
15	2	19	N	47,7	39,3	39,4	67,4
16	22	29	N	43,9	17,7	68,7	74,1
17	31	37	N	55,6	35,2	51,8	66,7
18	25	34	N	20,0	12,7	28,5	39,3
19	7	13	N	14,4	5,2	43,5	50,2
20	24	28	N	54,7	32,8	56,6	80,9

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	LAB 8			
				OD		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	74,9	24,6	1,7	0,9
2	9	11	SP	77,2	11,1	1,9	1,3

APPENDICE II

3	26	33	SP	24,0	23,2	1,4	2,6
4	17	21	SP	50,0	41,0	1,1	1,1
5	16	35	MP	21,5	11,9	2,5	3,2
6	14	32	MP	15,4	15,4	1,6	1,4
7	8	15	MP	18,4	14,2	2,2	3,6
8	6	39	SP	38,4	39,9	1,4	4,9
9	1	3	SP	44,7	35,2	1,3	4,0
10	20	23	SP	10,0	20,1	0,8	1,1
11	5	27	WP	27,7	30,9	4,4	13,4
12	18	30	MP	16,0	24,4	1,3	3,7
13	10	38	MP	26,1	21,5	3,0	5,9
14	12	36	WP	24,5	20,1	3,3	7,3
15	2	19	N	12,7	9,7	13,9	16,8
16	22	29	N	13,6	13,3	13,6	21,2
17	31	37	N	9,7	9,3	9,6	15,3
18	25	34	N	20,8	17,9	29,8	48,7
19	7	13	N	11,6	9,5	11,0	25,6
20	24	28	N	13,2	9,2	13,6	15,6

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	LAB 9			
				OD		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	11,6	8,6	0,2	0,3
2	9	11	SP	32,9	37,9	3,9	5,7
3	26	33	SP	20,1	20,1	1,7	3,1
4	17	21	SP	8,5	14,7	0,1	0,6
5	16	35	MP	15,7	27,5	1,6	5,7
6	14	32	MP	45,7	14,8	6,1	0,7
7	8	15	MP	22,6	25,2	3,4	7,5
8	6	39	SP	18,8	19,2	1,0	2,5
9	1	3	SP	16,3	26,2	0,5	4,0
10	20	23	SP	22,8	6,8	1,8	0,2
11	5	27	WP	19,4	17,8	4,0	7,2
12	18	30	MP	22,7	19,3	2,4	4,1
13	10	38	MP	5,7	5,3	2,1	5,6
14	12	36	WP	11,6	12,9	2,8	9,7
15	2	19	N	10,7	10,8	16,7	51,8
16	22	29	N	24,2	14,5	40,7	49,1
17	31	37	N	25,7	17,4	51,5	78,4
18	25	34	N	33,9	28,5	54,6	89,1
19	7	13	N	22,8	16,1	45,1	76,0
20	24	28	N	18,0	20,4	43,6	79,3

CV per ogni coppia di sieri analizzati in doppio considerando tutti i laboratori e tutte le prove

SIERO DI PARTENZA	SIERO DEL PANNELLO		RISULTATO ATTESO	OD		PI	
				1:5	1:10	1:5	1:10
1	4	40	SP	68,9	36,3	5,2	9,3
2	9	11	SP	44,3	45,7	3,6	4,7
3	26	33	SP	36,3	47,2	3,0	7,0

APPENDICE II

4	17	21	SP	29,7	30,4	1,3	1,3
5	16	35	MP	43,1	37,8	7,8	9,8
6	14	32	MP	37,4	44,5	6,5	5,9
7	8	15	MP	40,1	48,2	6,1	13,7
8	6	39	SP	31,4	42,1	4,7	5,0
9	1	3	SP	42,1	44,2	2,7	5,4
10	20	23	SP	43,0	30,1	6,3	2,7
11	5	27	WP	38,6	48,9	6,9	18,9
12	18	30	MP	38,0	46,7	4,1	8,4
13	10	38	MP	33,72	41,29	6,54	11,71
14	12	36	WP	38,1	44,4	8,6	18,3
15	2	19	N	30,8	31,9	75,7	113,5
16	22	29	N	30,8	29,5	71,9	98,2
17	31	37	N	34,2	30,8	85,1	133,4
18	25	34	N	28,5	28,7	84,3	126,8
19	7	13	N	30,3	25,8	60,2	107,4
20	24	28	N	30,8	32,7	91,3	107,9

APPENDICE V**Accordanza per ogni siero e per ogni laboratorio**

SIERO	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	Media senza 2 e 4	Media tutti i lab
1	100	67	100	67	100	67	100	100	40	86,71	82,33
2	100	47	100	67	100	67	100	100	100	95,29	84,56
3	100	67	100	47	100	47	100	100	100	92,43	90,44
4	100	100	100	67	100	100	100	100	100	100	92,67
5	100	67	100	67	100	27	67	100	40	76,29	74,22
6	100	100	100	40	100	67	100	100	100	95,29	89,67
7	67	67	67	47	100	40	40	100	47	65,86	63,89
8	100	40	100	67	100	67	100	100	40	86,71	79,33
9	100	100	100	47	100	100	100	100	100	100	85,89
10	100	47	100	67	100	100	100	100	100	100	90,44
11	40	47	100	67	47	47	67	67	100	62,14	61,00
12	47	67	100	67	100	47	67	100	67	75,43	73,56
13	27	27	60	40	47	47	47	100	100	64,00	57,22
14	100	40	47	13	47	47	40	67	100	66,86	57,89
15	100	100	100	100	100	100	40	100	100	100	100
16	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
17	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
18	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
19	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Concordanza per ogni siero e per ogni laboratorio

SIERO	LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5	LAB 6	LAB 7	LAB 8	LAB 9	Media senza 2 e 4	Media tutti i lab
1	87,50	76,04	87,50	74,65	87,50	76,04	87,50	87,50	48,96	81,7	79,24
2	85,42	32,64	85,42	59,72	85,42	74,31	85,42	85,42	85,42	95,2	75,46
3	72,92	85,42	72,92	27,78	72,92	59,03	72,92	72,92	72,92	90,5	67,75
4	95,83	81,60	95,83	81,60	95,83	95,83	95,83	95,83	95,83	100	92,67

APPENDICE II

5	52,08	26,74	52,08	26,74	52,08	42,36	36,46	52,08	46,88	56,9	43,06
6	75,00	10,42	75,00	23,96	75,00	67,71	75,00	75,00	75,00	95,2	61,34
7	43,75	43,75	46,53	29,17	43,75	47,92	47,92	43,75	46,53	49,7	43,67
8	83,33	48,96	83,33	71,18	83,33	73,26	83,33	83,33	48,96	81,7	73,23
9	89,58	48,61	89,58	64,58	89,58	89,58	89,58	89,58	89,58	100	82,25
10	89,58	34,03	89,58	77,78	89,58	89,58	89,58	89,58	89,58	100	82,10
11	39,58	25,00	31,25	17,36	36,11	41,67	42,36	31,25	41,67	45,1	34,03
12	55,56	31,60	64,58	19,10	64,58	55,56	64,58	64,58	61,11	74,9	53,47
13	36,81	36,81	30,21	32,29	45,14	47,22	45,14	22,92	47,92	41,3	38,27
14	54,17	33,33	47,92	28,47	36,11	48,61	42,71	28,13	54,17	52,8	41,51
15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
16	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
17	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
18	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
19	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

COR per ogni siero e per ogni laboratorio

COR											
siero	senza 2 e 4	tutti i lab	siero	senza 2 e 4	tutti i lab	siero	senza 2 e 4	tutti i lab	siero	senza 2 e 4	tutti i lab
1	1,46	1,22	6	1,01	5,47	11	2,00	3,03	16	1	1
2	1,01	1,78	7	1,95	2,28	12	1,03	2,42	17	1	1
3	0,45	4,51	8	1,46	1,40	13	2,53	2,16	18	1	1
4	1	1,00	9	1	1,31	14	1,80	1,94	19	1	1
5	2,44	3,81	10	1	2,06	15	1	1	20	1	1

Concordanza totale tra laboratori includendo i laboratori 2 e 4

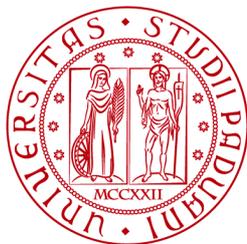
CATEGORIE SIERI	N	WP	MP	SP	TOTALI	Pi	Pe
1	0	1	5	48	54	0,80	
2	0	2	5	47	54	0,76	
3	0	0	13	41	54	0,63	
4	0	1	1	52	54	0,93	
5	0	3	20	31	54	0,46	
6	0	1	11	42	54	0,64	
7	0	2	25	27	54	0,46	
8	0	1	7	46	54	0,74	
9	0	3	2	49	54	0,82	
10	0	0	5	49	54	0,83	
11	0	10	26	18	54	0,37	
12	0	1	16	37	54	0,55	
13	0	8	29	17	54	0,40	
14	1	6	32	15	54	0,43	
15	54	0	0	0	54	1	
16	54	0	0	0	54	1	
17	54	0	0	0	54	1	
18	54	0	0	0	54	1	
19	54	0	0	0	54	1	
20	54	0	0	0	54	1	
TOTALI	325	39	197	519	1080	media Pi	0,740147
K	0,60						0,36

Valore di K multiplo

K multiplo	po	pe	p0-pe	1-pe
lab_1	0,91	0,54	0,37	0,46
lab_3	0,87	0,53	0,34	0,47
lab_5	0,87	0,53	0,35	0,47
lab_6	0,9	0,54	0,36	0,46
lab_7	0,91	0,53	0,37	0,46
lab_8	0,86	0,52	0,33	0,48
lab_9	0,91	0,55	0,36	0,45
k multiplo				0,76

BIBLIOGRAFIA

1. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2010, Chapter 1.1.4/5.
2. S.D. Langton et al" Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance",International Journal of Food Microbiology 79 (2002) 175-181
3. Lamberto Soliani con la collaborazione di Franco Sartore e Enzo Siri "Manuale di statistica per la ricerca e la professione statistica univariata e bivariata parametrica e non-parametrica per le discipline ambientali e biologiche" edizione aprile 2005 <http://www.dsa.unipr.it/soliani/soliani.html>
4. J. Richard Landis e Gary G. Koch del 1977 "The measurement of observer agreement for categorical data" Biometrics, Vol. 33, pp.159-174.
5. P. Quatto (2004). "Un test di concordanza tra più esaminatori". In: Statistica, vol. 64, n. 1, pp. 145-151.
6. P. Quatto (2004). "Un test sulla natura casuale dell'accordo tra più esaminatori". In: Statistica Applicata, vol. 16, n. 3, pp. 375-384
7. R.H. Jacobson (1998) - Validation of serological assay for diagnosis of infectious diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 17, 2, 469-486.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA VETERINARIA

A CICLO UNICO

TESI DI LAUREA

**INDAGINI SULLA INFEZIONE DA BORNA VIRUS IN
EQUINI DELLE PROVINCE AUTONOME DI TRENTO E
BOLZANO**

RELATORE : PROF. MARCO MARTINI

CORRELATORE: DOTT. STEFANO GENERO

LAUREANDA: ELISA STEFANI

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Prof. Marco Martini dell'Università di Medicina Veterinaria degli Studi di Padova, il Dott. Stefano Genero, la Dott.ssa Paola De Benedictis, Crispina Veggiato, il Dott. Calogero Terregino e il personale della sezione di Virologia Speciale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro). Il Dott. Gian Luca Autorino, Dott. Marcello Sala, Dott.ssa Teresa Sicluna del Centro di Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana. Il Dott. Giovanni Farina e il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Trento. La Dott.ssa Dorotea Lombardo e il personale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Bolzano.

INDICE

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

1.1	La malattia di Borna.	
1.2	Eziologia.	
1.2.1	Classificazione.	
1.2.2	Replicazione.	
1.3	Epidemiologia.	
1.3.1	Distribuzione geografica.	
1.3.1.1	BDV infezione nella popolazione equina Italiana.	
1.3.1.2	Epidemiologia Molecolare.	
1.3.2	Spettro d'ospite.	
1.3.3	Via di trasmissione.	
1.4	Patogenesi.	
1.4.1	Neuroinvasione e propagazione.	
1.5	Sintomatologia.	
1.5.1	Infezione naturale.	
1.5.2	Infezione sperimentale.	
1.6	Lesioni anatomo-istopatologiche.	
1.7	Profilassi e Terapia.	
1.8	Infezione nell'uomo.	
1.9	Diagnosi.	
1.9.1	Intra vitam.	
1.9.2	Post mortem.	
1.10	BDV infezione nella popolazione equina italiana.	

CAPITOLO II: OBIETTIVI DEL LAVORO.

CAPITOLO III: MATERIALI E METODI.

3.1	Campionamento.	
3.1.1	Criteri di selezione degli equidi testati.	
3.2	Sierologia.	
3.2.1	Immunofluorescenza indiretta (IFA).	

CAPITOLO IV: RISULTATI E DISCUSSIONE.

BIBLIOGRAFIA.

ALLEGATI.

CAPITOLO I: INTRODUZIONE

1.1 LA MALATTIA DI BORNA

BDV è l'agente eziologico della malattia di Borna (BD). Questa patologia si manifesta attraverso una forma di encefalomyelite che colpisce principalmente cavalli e pecore. La zona endemica comprende soprattutto alcune zone della Germania, alcune aree della valle del Reno nel territorio svizzero, Austria e Principato del Liechtenstein. Tra il 1894 e il 1896 una grande epidemia di BDV si verificò tra i cavalli dell'esercito nella città di Borna, nello stato della Sassonia (Germania). La malattia e il suo agente virale prendono il nome dal luogo di questo primo grande focolaio (Dürwald R. & Ludwig H. 1997; Gwenaëlle D. *et al* 2002).

A partire da quegli anni, per arrivare fino ad oggi, la malattia ha assunto un andamento endemico con decine di segnalazioni annue. A seguito di una prima relazione in cui si sospettò che BDV o virus ad esso correlati potessero essere associati a disturbi psichiatrici dell'uomo, le questioni riguardanti l'epidemiologia di BDV divennero di interesse comune per molti virologi medici e veterinari. Prove accumulate hanno indicato che le infezioni da BDV potrebbero verificarsi in tutto il mondo in diverse specie di vertebrati, compresi gli esseri umani, e i primi studi di follow-up sembrano confermare il legame tra BDV e alcune malattie mentali umane. La questione se BDV sia da considerarsi una sospetta zoonosi, e la possibilità di una sua distribuzione mondiale, è altamente controversa e il dibattito è tutt'ora in corso (Staehele P. *et al* 2000).

1.2 EZIOLOGIA

1.2.1 CLASSIFICAZIONE

Il *Virus della malattia di Borna* (BDV) è un virus dotato di *envelope*, ad RNA, non segmentato, a polarità negativa, che trascrive e replica il genoma in sede nucleare, privo di potere citopatico e con spiccato neurotropismo replica primariamente nei neuroni e successivamente nelle cellule della glia; classificato come virus prototipo della nuova

famiglia di costituzione delle *Bornaviridae*, appartiene all'ordine *Mononegavirales* (Staeheli P. et al 2000).

L'ordine *Mononegavirales* comprende anche le famiglie: *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* e *Paramyxoviridae*.

I *Rhabdovirus* hanno aspetto di proiettile, i *Filovirus* sono virus filamentosi e i *Paramyxovirus* sono pleomorfi. Benché il genoma del virus sia simile a quello dei *Rhabdovirus*, alcuni studi di microscopia elettronica hanno dimostrato che le particelle virali hanno forma sferica con diametro compreso tra i 100 e 130 nm e con un core elettrondenso di circa 50-60 nm delimitato da una membrana pericapsidica (*envelope*) di 4 nm di spessore che si presenta circondata da proiezioni di 7 nm di lunghezza (fig.1) (Kohono T. et al 1999; Richt J. & Rott R. 2001).

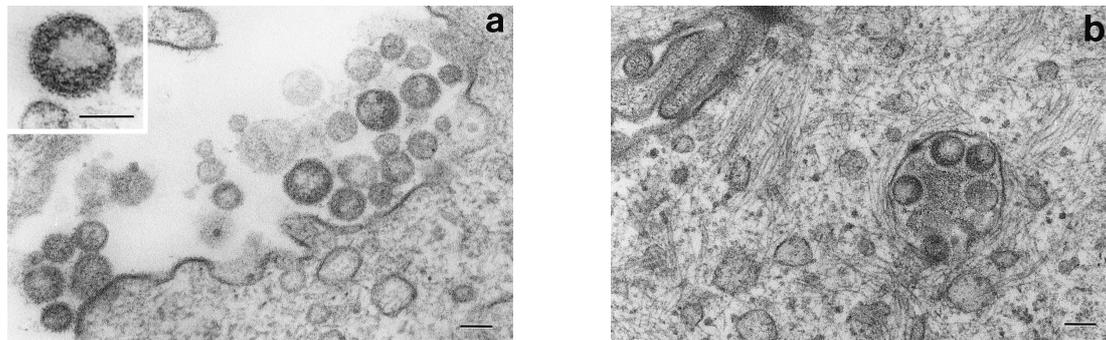


Fig.1 Sezione ultrasottile di cellule MDCK infette da BDV. (a) particella virale extracellulare ad alta magnificazione; (b) particella virale nel vacuolo citoplasmatico. Bars 100nm (Kohono T. et al 1999 modificata).

Il genoma virale consiste di una singola molecola di RNA non segmentato (NNS) a polarità negativa ed è costituito da 8910 nucleotidi (8.9 Kb), quindi è molto compatto se comparato con gli altri virus RNA NNS (da 11 a 15 Kb). Il genoma ha sei ORFs maggiori (*Open Reading Frame*), che codificano per le proteine p40, p24, p10, (g)p16, p56 e p180 (Fig.2). In considerazione delle regioni del genoma dove vengono codificate, della loro massiccia presenza sia nelle cellule infette che nelle particelle virali, unitamente alle loro proprietà biochimiche e alle sequenze che le caratterizzano, le proteine p40, p24 e p16 corrisponderebbero, rispettivamente, alla nucleoproteina virale (NP), alla fosfoproteina (P) attivatrice del processo di trascrizione e alla proteina di matrice (M). Le stesse evidenziabili in altri virus RNA NNS. Due isoforme della proteina NP (p40 e p38) sarebbero state anch'esse evidenziate nelle cellule infette con BDV e sembrerebbe che la

loro espressione derivi da due diversi tipi di RNAm, oppure da una capacità differenziale codificante da parte di codoni che costituiscono il gene p40 del virus. La proteina p16, o proteina M, a differenza degli altri virus RNA NNS, in BDV si presenta glicosilata. E' localizzata nell'envelope e dovrebbe essere coinvolta nel processo di adsorbimento del virus alla cellula. Per quanto concerne la proteina p56, a giudicare dall'organizzazione delle sue sequenze, dovrebbe corrispondere alle glicoproteine superficiali (G) come presenti negli altri componenti del gruppo dei virus con RNA NNS. In realtà, il gene p56 è responsabile della sintesi di due polipeptidi glicosilati, GP-84/94 e GP-43. Gli anticorpi indotti dalla proteina p56 hanno attività neutralizzante, pertanto i prodotti del gene p56 rivestono un ruolo importante nelle fasi precoci dell'infezione sostenuta da BDV. Il gene p180 esprime la sintesi di un'altra proteina, la p190, che assieme alla p24 formerebbero un complesso polimerasi (Luo M. *et al* 2007; Richt J. & Rott R. 2001).

La proteina p10 o X regola l'attività polimerasica e sembra essere essenziale per la moltiplicazione virale (Poenisch M. *et al* 2007).

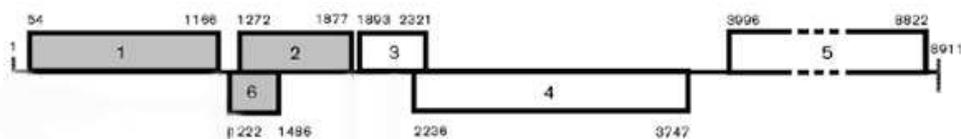


Fig. 2 BDV; ORF che codificano per le diverse proteine: 1 (nucleoproteina), 2 (fosfoproteina), 3 (proteina di matrice), 4 (glicoproteina dell'envelope), 5 (RNA polimerasi RNA dipendente) e 6 (proteina X) (Kolodziejek J. *et al* 2005 modificata).

Nel 1996, durante l'*International Congress of Virology*, la famiglia *Bornaviridae* è stata creata appositamente per BDV in quanto esso si presenta con caratteri unici. E' l'unico virus RNA NNS che ha sede di replicazione e trascrizione nucleare (caratteristica che ne favorisce la persistenza all'interno del SNC), è anche caratterizzato da neurotropismo privo di potere citolitico, basso tasso di replicazione e persistenza nel SNC. Altra particolarità è la capacità di attraversare lunghissimi periodi di latenza e brevi periodi di attivazione che si alternano per tutta la durata della vita dell'ospite. Infine, a differenza della maggior parte degli altri RNA virus, il genoma di BDV sembra apparire estremamente stabile nel tempo, nello spazio (diverse aree geografiche) e nelle varie specie. Secondo la maggior parte degli autori il genoma di BDV rimane stabile anche dopo centinaia di passaggi seriali (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Diversi ceppi di BDV sono stati isolati da cavalli infetti, pecore e altri animali, e le loro sequenze sono state in parte o completamente determinate. Le sequenze del genoma di frammenti di BDV amplificati mediante RT-PCR dall'encefalo di cavalli, pecore, asini, cani e gatti sono stati pubblicati e depositati in *EMBL/database GenBank*. Parte di queste informazioni sono state usate per costruire l'albero filogenetico mostrato in (Fig.3), che si basa sulla sequenza del frammento nucleotidico del gene p24 (proteina P). Questo confronto ha rivelato che la maggior parte dei ceppi sono altamente correlati tra loro e presentano differenze genomiche inferiori al 5%. Curiosamente, le mutazioni nucleotidiche nel genoma dei ceppi europei classici di BDV non sono distribuiti casualmente (Fig.4). Sembra probabile che alcuni vincoli funzionali non riconosciuti tra cui strutture secondarie o terziarie di RNA limitino le alterazioni nella sequenza in alcuni punti. In alternativa, la distribuzione non casuale di scambi di base nel genoma di ceppi europei comuni di BDV potrebbe semplicemente indicare la comune provenienza da gruppi di cellule progenitrici geneticamente stabili (Binz T. *et al* 1994; Staeheli P. *et al* 2000).

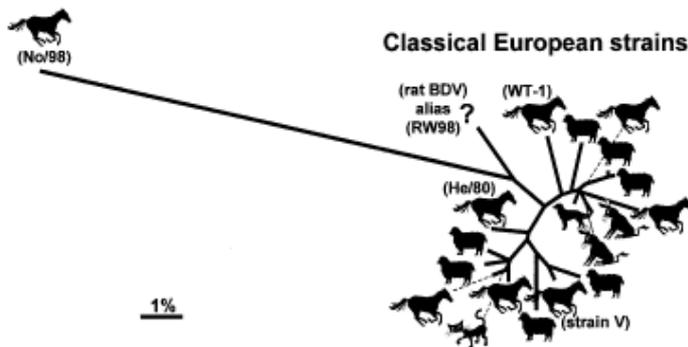


Fig.3 Albero filogenetico dei ceppi di campo BDV. L'albero si basa su sequenze di nucleotidi (aminoacidi 71-181) che codificano per la proteina P. Si noti che tutti i ceppi europei classici sono strettamente legati, anche se provenienti da specie diverse. Si noti anche la posizione remota nell'albero filogenetico del ceppo No/98 isolato da un pony della Stria (Austria). (Binz T. *et al* 1994 modificata)

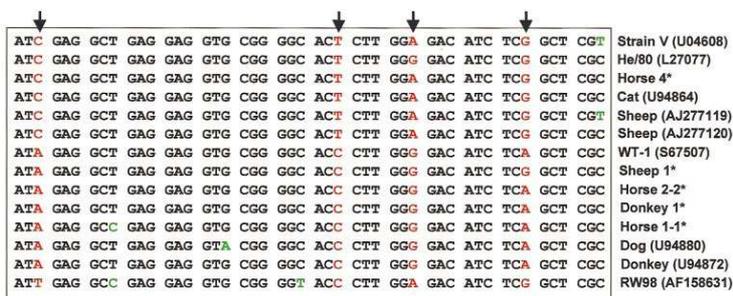


Fig.4 Distribuzione non casuale degli scambi di nucleotidi nei ceppi europei classici di BDV. Viene mostrato un breve tratto di sequenza virale (nucleotidi 1533-1580) del gene p24. Le posizioni in cui lo scambio di nucleotidi sono state osservate più frequentemente sono contrassegnate dalle frecce e dal colore rosso. Per ragioni sconosciute, le mutazioni in queste posizioni sono altamente preferite. Modelli analoghi di mancato scambio di nucleotidi casuali sono stati osservati anche in altre parti del genoma virale (Binz T. *et al* 1994 modificata).

Dall'ulteriore confronto delle sequenze è emerso che i ceppi BDV provenienti da varie specie ospiti sembrano mancare di specificità. Virus isolati da cavalli, non mostrano un

elevato grado di diversità da quello isolato da pecore, asini o altri ospiti (Fig.3). Poiché in ogni cluster di infezione documentato, sembra essere coinvolta una sola specie alla volta, come ad esempio il cavallo o la pecora, l'assenza di pattern genetici riconducibili all'adattamento alla specie ospite è inaspettata. Poiché questo non è stato osservato, i dati sembrano puntare verso una singola fonte da cui i vari animali di allevamento acquisiscono il virus. Questo sosterrrebbe l'ipotesi che soggetti persistentemente infetti o alcuni insettivori selvatici (*Crocidura leucodon*) possano fungere da serbatoio per il virus, e che gli animali potrebbero contrarre l'infezione da mangimi che sono contaminati con l'urina di tali animali infetti (Hilbe M. *et al* 2006).

1.2.2 REPLICAZIONE

Secondo alcuni autori (Bode L. & Ludwig H. 2003; Carbone K. *et al* 1987; Durrwald R. *et al* 2006; Kohono T. *et al* 1999) la penetrazione del virus nella cellula avviene per endocitosi mediata da recettori di cui non si conosce ancora l'esatta identità. Nel processo appaiono coinvolte anche le proteine G ed M. Negli endosomi l'ambiente acido favorisce la fusione fra l'*envelope* del virus e la membrana cellulare, dopodiché le proteine ribonucleiche (RNP) del virus vengono rilasciate nel citoplasma e trasportate nel nucleo della cellula dove avviene la trascrizione e la replicazione. Le cellule infettate con BDV presentano un comportamento piuttosto eterogeneo nell'esprimere gli antigeni virali. A questo proposito, le proteine NP, P e p10 vengono espresse nel nucleo e nel citoplasma e sono gli antigeni virali sintetizzati alle concentrazioni più elevate dalla maggior parte delle cellule infette, mentre nel caso della proteina G, solo una percentuale variabile da una a dieci delle cellule infette risultano in grado di produrla. L'espressione a tutta lunghezza della proteina G (GP 84/94) si realizza soprattutto sulla membrana nucleare e sul reticolo endoplasmatico. Ancora non è nota la distribuzione della proteina M nell'ambito della cellula infetta, mentre è stato rilevato che questa proteina, unitamente alla proteina G, viene glicosilata dopo la trascrizione. Anche le informazioni sulla maturazione (acquisizione dell'*envelope*) non sono ancora chiare, mentre la sua fuoriuscita dalla cellula per gemmazione è stata osservata soltanto sulla membrana cellulare di cellule MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) in seguito al trattamento delle cellule con n-butirrato. I ribonucleocapsidi di BDV si accumulano nel nucleo e, alla stessa stregua di quanto si osserva nel caso di altri virus con genoma RNA NNS, anch'essi risultano infettati a giudicare dalla loro accertata capacità di indurre le sintesi macromolecolari virali, come

pure dalla loro capacità di produrre BDV infettante associato alle cellule in seguito a transfezione di cellule recettive al virus. L'osservazione di sezioni ultrasottili di cellule infette consente il rilievo in sede citoplasmatica di particelle simil-virali con caratteristiche morfologiche simili a quelle tipiche dei virioni infettanti di BDV al di fuori della cellula. Le suddette particelle non risultano associate alle cisterne del reticolo endoplasmatico, né dell'apparato di Golgi e a nessun'altra membrana intracitoplasmatica (Castrucci G. 2002).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

1.3.1 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

Anche se l'infezione di BDV è stata per anni descritta solo in cavalli e ovini e alcuni animali selvatici (ad esempio conigli) delle zone tedesche, con l'avvento dei più moderni strumenti per la diagnosi di infezioni da BDV (quali ad esempio l'ibridazione in situ e la [RT-PCR]) e con il crescere dell'interesse della ricerca internazionale, i rapporti di specie sensibili e le aree geografiche di casi di infezione naturale sono aumentati. Animali a rischio di infezione naturale o sperimentale comprendono scimmie rhesus, cavalli, pecore, bovini, capre, conigli, daini, lama, alpaca, gatti, ratti, topi, roditori (*Crocidura leucodon*), gerbilli, cani, struzzi e specie aviari dell'ordine psittaciformi. La ricerca e il ritrovamento di anticorpi specifici per BDV, sia in sieri equini che umani, evidenziano inoltre che l'infezione naturale sia diffusa oltre i confini dell'Europa centrale con segnalazioni in: Francia, Polonia, Svezia, Regno Unito, Israele, Giappone, Australia, Stati Uniti, Iran, Taiwan, Bangladesh (Durrwald R. *et al* 2006; Kolodziejek J. *et al* 2005); anche se nei cavalli australiani è stata riscontrata una bassa prevalenza di *marker* di infezione, che non permette di parlare di diffusione endemica di BDV (Kamhieh S. *et al* 2005). In Italia solo ultimamente si sta prendendo atto dell'esistenza della BD (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Nelle aree endemiche per BDV (Fig.5) del centro Europa figurano la Germania (con distinte regioni al suo interno: stati federali di Baviera, Baden-Wurtemberg, Assia, Bassa Sassonia, Sassonia-Anhalt, Sassonia e Turingia), la parte orientale della Svizzera (cantoni Grigioni e Sankt Gallo), il Principato del Liechtenstein, e lo stato federale più occidentale d'Austria (Vorarlberg) (Kolodziejek J. *et al* 2005).

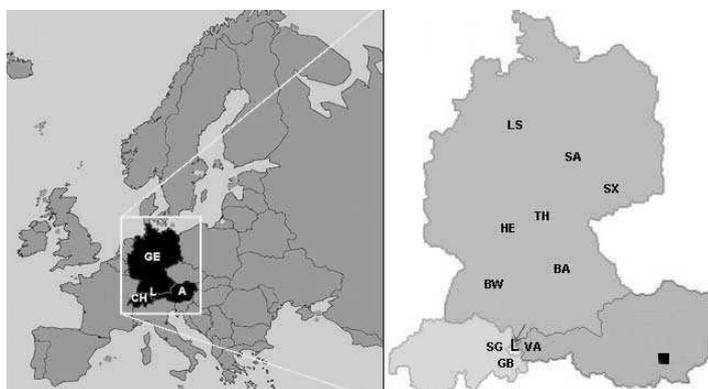


Fig.5 Carta dell'Europa in cui sono evidenziati i quattro paesi con zone endemiche per BDV. A sinistra: A per L'Austria, CH per la Svizzera, GE per la Germania, L per Liechtenstein. A destra un ingrandimento di queste quattro aree: BA Bavaria, BW Baden-Wurtemberg, GB Graubuenden, HE Hesse, L Liechtenstein, LS Lower Saxony, SA Saxony-Anhalt, SG Sankt Gallen, SX, Saxony, TH Thuringia, VA Vorarlberg. Il quadrato indica la zona dove è stato trovato isolato il sottotipo No/98 (nello Stato Federale della Stiria) (Kolodziejek J. *et al* 2005).

1.3.1.1 BDV INFEZIONE NELLA POPOLAZIONE EQUINA ITALIANA

In Italia non sono state svolte molte indagini circa la sieroprevalenza per Borna negli equidi. Uno degli studi a cui riferirsi per valutare lo stato attuale in Italia è stato condotto da Codazza e collaboratori: sono stati testati 708 sieri equini provenienti da varie regioni d'Italia (Nord, Est e Centro), distribuiti per classe altitudinale, età e sesso. La suddivisione in classi è stata effettuata sulla base dell'attitudine dei cavalli testati: cavalli semiselvatici (cavalli della Giara), cavalli da sella (cavalli da scuola, trekking, concorso), cavalli Purosangue Inglese (galoppatori) e trottatori. I campioni sono stati testati mediante metodo ELISA per la ricerca di Ag, Ab e CIC. Le frequenze delle varie classi di positività sierologica sono state confrontate fra loro attraverso l'utilizzo del test χ^2 corretto secondo Yates.

Dei 708 sieri testati il 23.4% è risultato positivo all'infezione da BDV (dato che rispecchia i valori medi del 20-40% noti in letteratura per equidi apparentemente sani). La differenza di positività tra maschi (15.9%) e femmine (28.1%) è risultata significativa, e tra le femmine

un fattore di rischio è rappresentato dall'attività riproduttiva indipendentemente dall'età dei soggetti; difatti femmine in età riproduttiva hanno mostrato una positività superiore rispetto a quelle non in attività. Il valore di sieroprevalenza del gruppo dei galoppatori risulta significativamente più elevato (38.2%) rispetto a quanto rilevato nei trottatori (28.9%) e nei cavalli da sella (11.4%). L'appartenenza alla classe dei Purosangue Inglese rappresenta un fattore di rischio legato probabilmente a fattori genetici e di management. La prevalenza di infezione del gruppo dei cavalli semi-selvatici risulta inferiore al 3%, dati nettamente scostanti da quelli ottenuti da un gruppo di ricerca giapponese (26.9%) che ha operato su una popolazione equina autoctona (cavalli Misaki). Non è stata evidenziata una differenza significativa in funzione dell'età dei soggetti testati.

Le indagini filogenetiche effettuate hanno evidenziato come i ceppi circolanti in Italia (sottogruppo A, Fig.6) abbiano un'altissima omologia col ceppo di riferimento V e siano pertanto in linea con quanto noto in letteratura.

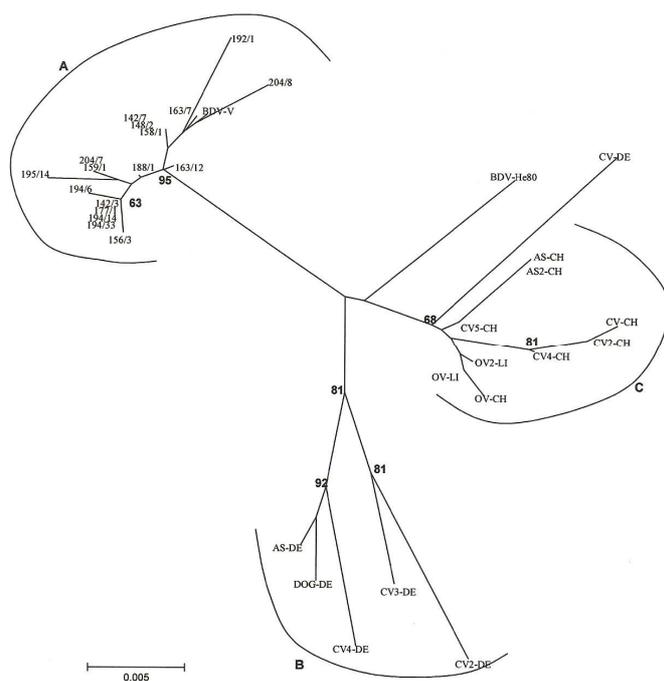


Fig.6 Albero filogenetico ottenuto mediante metodo Neighbor-Joining, sulla base dei frammenti di 605nt della regione del gene codificante per la proteina p24 isolati dalla popolazione equina e ottenuti dalle sequenze di GenBank/EMBL. Si osservi come i ceppi di BDV isolati da cavalli italiani tendono a formare un cluster (A) particolarmente conservato insieme al ceppo di riferimento BDV V. I gruppi B e C appartengono a ceppi di BDV provenienti da Germania e Svizzera-Liechtenstein (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Questi primi dati dimostrano sia la presenza di BDV nella popolazione equina italiana sia come il nostro Paese possa a tutti gli effetti considerarsi un'area ove l'infezione da BDV assume i caratteri di endemicità (Pisoni G. *et al* 2007).

1.3.1.2 EPIDEMIOLOGICA MOLECOLARE

Da alcuni studi si mise in evidenza che alcune sequenze di BDV di cavalli, pecore, gatti ed esseri umani isolate in Giappone, Taiwan, Iran, Gran Bretagna e Stati Uniti siano quasi identiche ai ceppi di laboratorio isolati dal centro Europa (ceppo V, He/80, RW98 e H1766); le loro sequenze di acidi nucleici infatti differiscono meno del 5%, supportando l'ipotesi di una non specie-specificità del virus e della sua alta conservazione genetica (Kolodziejek J. *et al* 2005). Questi risultati possono comunque essere interpretati in diversi modi: una variante di BDV dell'Europa centrale isolata e adattata a crescere in conigli venne utilizzata come vaccino vivo attenuato (ceppo 'Dessau') in alcuni parti della Germania. Poiché la sua efficacia risultò discutibile, l'utilizzo di questo vaccino è stato interrotto intorno al 1980 nella Germania occidentale e pochi anni dopo, nella Germania orientale. Così, esiste la possibilità remota che il vaccino con tale ceppo (o per fuga del virus da esso) abbia dato origine al ceppo isolato nei paesi sopra citati. In alternativa, rimane la possibilità che le relazioni sul rilevamento di BDV negli animali e nelle persone provenienti da paesi non europei rappresentino manufatti derivanti da contaminazioni accidentali dei campioni con ceppi di virus di laboratorio; infatti i due ceppi V e He80 vengono utilizzati come ceppo-madre rispettivamente per i laboratori che fanno capo a Berlino e per quelli di Giessen (Durrwald R. & Ludwig H. 1997). E' anche ipotizzabile che esistano in tutto il mondo delle vere miscele di ceppi virali, ma poiché tutti utilizzano le stesse tecniche per individuare il virus, solo alcuni ceppi si rendono visibili. Un'altra possibilità considera tali ceppi provenienti direttamente dall'esportazione di cavalli dal centro Europa. Questione ancora irrisolta è il perché la BD sia rimasta per secoli confinata in ben delimitate aree endemiche del centro Europa, nonostante non siano mai state applicate misure restrittive nella movimentazione degli animali, sia tra le aree endemiche e il resto d' Europa, sia tra esse e il resto del mondo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

L'isolamento e la caratterizzazione del nuovo sottotipo No/98, la cui sequenza differisce notevolmente dai virus del gruppo classico europeo (Fig.7), riveste grande importanza dal punto di vista epidemiologico. Esso dimostra che alcune varianti naturali di BDV possano facilmente sfuggire ad un controllo mediante RT-PCR.

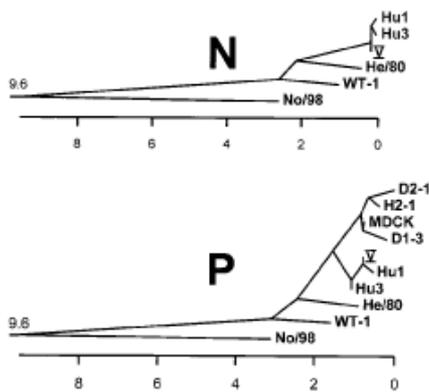


Fig.7 Alberi filogenetici di ceppi di BDV. Sono stati eseguiti confronti della sequenza nucleotidica dei frammenti della regione codificante per il gene N (corrispondenti ai nucleotidi 262-829 V) e dalla regione codificante per il gene P (corrispondenti a 1482-1814 V). Le distanze tra i ceppi indicano la percentuale di divergenza della sequenza. (Nowotny N. et al 2000).

Questo ceppo venne isolato da un pony stallone di sette anni, nato nello stato federale austriaco della Stiria, area indenne per BDV. L'animale non entrò mai nelle regioni endemiche. Il pony presentava un quadro clinico e istopatologico corrispondente alla malattia classica di Borna, la diagnosi preliminare venne poi confermata dall'individuazione immuno-istochimica dell'antigene BDV in sezioni di cervello in paraffina. Inaspettatamente però, l'RNA non venne rilevato nel materiale cerebrale mediante RT-PCR in uso nei protocolli standart utilizzati fino a quel momento; No/98 si differenzia da tutti gli altri ceppi di circa il 15% a livello nucleotidico (Nowotny N. et al 2000). È interessante notare che la conservazione a livello di aminoacidi è molto elevata (93-98%) fatta eccezione per la proteina p10 (proteina X), che è solo l'81% identica alle controparti in altri ceppi di BDV (Fig.8).

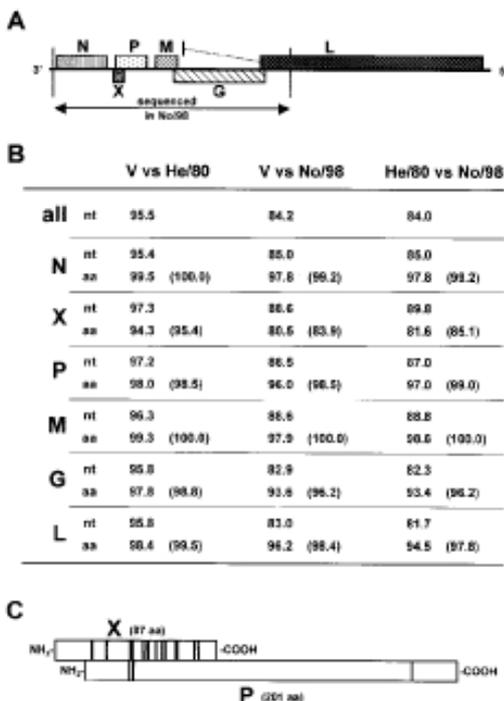


Fig.8 Confronto tra le sequenze di nucleotidi e aminoacidi di BDV No/98 e ceppi di laboratorio comune.
A Sono stati sovrapposti il sequenziamento di nucleotidi 25-4.234, prodotti con RT-PCR di No/98 a posizioni del ceppo V di riferimento. Questo frammento comprende le sequenze complete che codificano per le proteine virali N, X, P, M e G e la parte del gene L.
B Confronto di nucleotidi (nt) e di aminoacidi (aa) No/98 e sequenze di ceppi di laboratorio V e He/80. Sono indicate le percentuali di identità di sequenza complessiva (tutti) o delle identità dei prodotti di sequenza di particolari geni a livello di nucleotidi e aminoacidi.
C Viene indicata con sovrapposizione della regione la conservazione fortemente orientata della sequenza della proteina P nel gene XP. Le posizioni di scambi non conservative di aminoacidi delle proteine X e P sono indicate da barre verticali (Nowotny N. et al 2000).

E' possibile, quindi, che le infezioni da BDV siano più frequenti di quanto si creda. Il lavoro con No/98 suggerisce inoltre che ulteriori varianti di BDV con distinte caratteristiche strutturali possano essere presenti al di fuori dell'Europa centrale. Se, come nel caso di No/98, sono conservati i principali antigeni anche di altri ceppi di BDV non ancora identificati, allora i virus possono essere identificati con metodi di immuno-istochimica utilizzando un cocktail di anticorpi monoclonali piuttosto che mediante RT-PCR. Le nuove scoperte implicano che i precedenti studi, che fanno affidamento sulla tecnologia RT-PCR tradizionale, potrebbero avere sottovalutato i tassi di prevalenza e correlazione eziologica delle infezioni umane da BDV (Nowotny N. *et al* 2000).

L'isolamento di un BDV con un genoma altamente variante scalfisce inoltre l'opinione generale dell'alta conservazione sequenziale genomica di BDV, ed apre la possibilità all'esistenza di sottotipi non ancora identificati come dimostrato anche da uno studio effettuato su gatti che, al fine di ottenere un miglior strumento clinico diagnostico per BD felino, ha sviluppato un test *real time* (rRT-PCR) su due piani di analisi. Sonde *TaqMan* e primer specifici sono stati progettati per i geni P ed L di BDV, per allineare le sequenze di ceppi BDV noti. Il test riconosce i ceppi V, He/80 e No/98. Il sistema ha rilevato, oltre ai ceppi citati, varianti di BDV in cinque gatti naturalmente infetti e una variante in gatti infettati sperimentalmente. Questo saggio rRT-PCR potrebbe risultare un potente strumento per ulteriori studi di screening epidemiologico e mostra come una differente metodica diagnostica possa mettere in luce nuovi sottotipi ancora non conosciuti (Wensman J. *et al* 2007).

Un altro studio avente lo scopo di acquisire conoscenze più dettagliate relativa all'evoluzione genetica e alla variabilità dei virus della malattia di Borna (BDV) provenienti da diverse regioni all'interno di aree BD-endemiche, ha permesso per la prima volta di stabilire geograficamente sottogruppi con sequenze di cluster separati. Sono state effettuate analisi filogenetiche su 33 campioni di BD virus raccolti da diverse specie animali (Cavalli, pecore e asini), provenienti da diversi paesi dell'Europa centrale (Germania, Svizzera e il Principato del Liechtenstein) in diversi anni (1985-1998). Sono stati utilizzati come ceppi di riferimento:

- Borna V isolato nel 1920 dalla sospensione di cervello di cavallo proveniente dalla Bassa Sassonia, (Germania);

- Borna HE/80 isolato nel 1980 da colture cellulari infettate con materiale proveniente da un cavallo con sintomatologia specifica originario di Baden-Wurtemberg (Germania);
- Borna H1766 isolato dalla sospensione di cervello di un cavallo proveniente dall'alta Sassonia,(Germania);
- Borna No/98 isolato dal cervello di un pony proveniente da una zona dell'Austria (Styria) dove Borna Disease non è endemica.
- BDV Dessau isolato da un cavallo naturalmente infetto della Germania est e successivamente adattato a crescere in colture di coniglio per creare il vaccino vivo usato tra il 1949-1992.

Sono stati così identificati cinque diversi *cluster* che potrebbero essersi stabiliti all'interno delle aree endemiche, corrispondentemente alle regioni geografiche da cui il virus ha origine:

- (I) gruppo per Svizzera, Austria, Valle del Reno e Liechtenstein
- (II) o He/80 gruppo per Baden-Wurtemberg e Baviera
- (III) o RW98 gruppo con presenza limitata alla Baviera
- (IV) o 'Dessau' gruppo per il sud Sassonia-Anhalt e confine settentrionale della Sassonia
- (V) un gruppo misto (simili ai ceppi V e H1766), costituito da campioni di diverse zone della Germania, formato prevalentemente da Stati federali della Turingia e Bassa Sassonia.

E' stata poi effettuata una accurata analisi delle sequenze genomiche dei quattro ceppi di riferimento, mediante multiallineamenti, che ha mostrato:

- ✓ un' identità di sequenza del 96%-99% per quanto riguarda p40, dei ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- ✓ un' identità di sequenza del 97%-99% per quanto riguarda p24, dei ceppi Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766;
- ✓ un' identità di sequenza compresa tra l'80%-85% per quanto riguarda p40 e p24 per il Borna No/98 rispetto a Borna V, Borna HE/80 e Borna H1766.

Quindi BDV isolati dalla stessa area geografica dimostrano chiaramente un grado più elevato di identità rispetto ad ogni altro BDV isolato da altre regioni, indipendentemente

dalla specie ospite e dall'anno di isolamento. Inoltre si evince che nonostante la stabilità del genoma insolitamente alta di BDV, all'interno delle diverse aree geografiche, le variazioni di sequenza esistono (Kolodziejek J. *et al* 2005).

Il legame geografico avvalorava ulteriormente l'ipotetico ruolo, sollevato in diversi studi epidemiologici, di alcune specie quali serbatoio dell'infezione (Hilbe M. *et al* 2006).

La distribuzione mista di tre tipi genetici in Baviera e la separazione chiara dei due tipi nella parte orientale della Germania, in una regione esente da barriere geografiche, spinge verso l'ipotesi dell'esistenza di diverse specie di serbatoi o vettori strettamente connessi al territorio. L'ipotesi delle specie serbatoio è ulteriormente supportata dal fatto che gli ospiti finali (cavalli e pecore) mostrano un vincolo di *clustering* non spiegabile da un punto di vista geografico (Kolodziejek J. *et al* 2005). I ceppi Italiani fino ad ora analizzati tendono a formare un cluster particolarmente conservato assieme al ceppo di riferimento BDV V, ma con un gruppo (definito come gruppo A) distinto dai gruppi (B e C) provenienti rispettivamente da Germania e Svizzera-Liechtenstein (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Doverosa è l'apertura di una parentesi per quanto concerne BDV nella specie aviaria. Recentemente è stato creato un nuovo genere all'interno della famiglia *Bornaviridae* indicato come *Bornavirus Aviaria* (ABV) in cui sono stati definiti 6 gruppi genomici differenti (ABV-1; ABV-2; ABV-3; ABV-4; ABV-5; ABV-6) (Weissenböck H. *et al* 2009) (Fig.9)

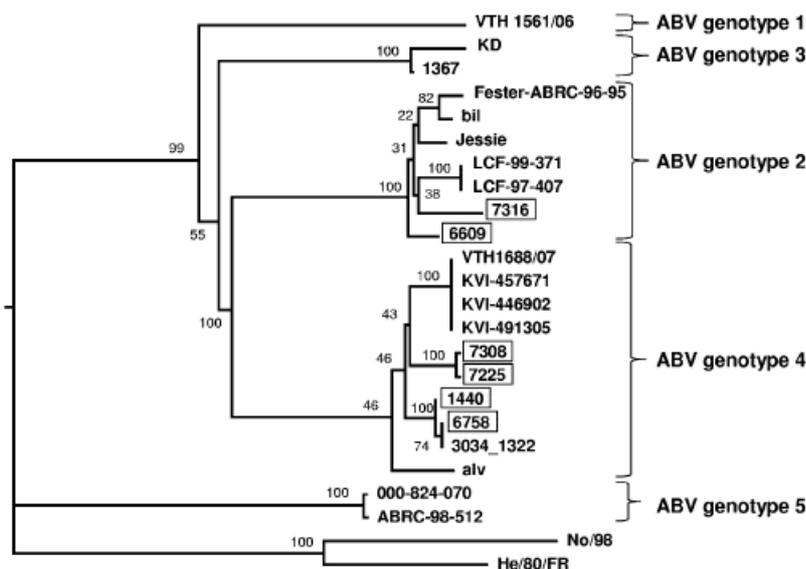


Fig.9 Albero filogenetico di ABV basato sulla sequenza del gene N (Rinder M. *et al* 2009).

La differenziazione si è resa necessaria sotto diversi aspetti. Nonostante il genoma di ABV mostri un'identità di sequenza con BDV del 65%, esistono delle differenze notevoli tra i

due virus. In ABV la regione tra il gene N e X è più corta rispetto a BDV; invece analogamente a BDV, il sito S2 di inizio sintesi per mRNA di X/P è posizionato a monte del segnale di terminazione T1, ma in ABV si trova immediatamente a valle del codone di stop della N ORF (*open reading frame*), inoltre il frammento nucleotidico 22 trovato tra il segnale T1 e X ORF manca in BDV (Fig.10) (Rinder M. *et al* 2009).

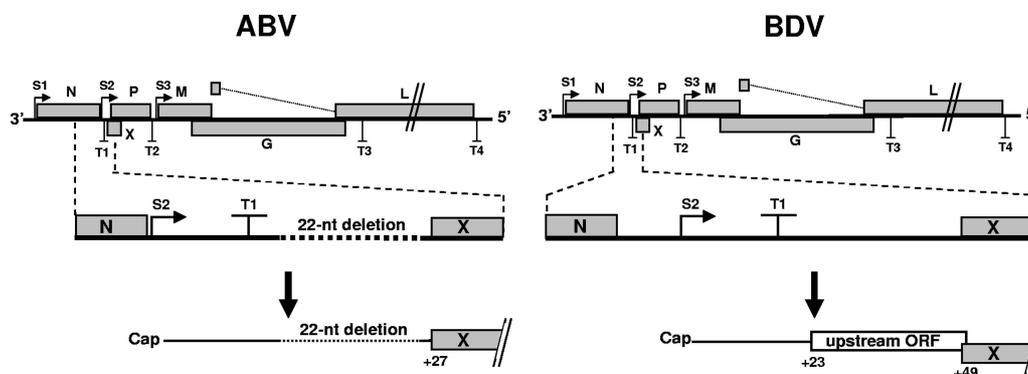


Fig.10 ABV e BVD sembrano utilizzare differenti strategie per controllare l'espressione della seconda unità virale. In questo disegno schematico si mostrano i siti di inizio trascrizione (da S1 a S3) e di stop (da T1 a T4) in entrambi i siti genomici virali (nt: nucleotide) (Rinder M. *et al* 2009).

Infezioni sperimentali hanno dimostrato che ABV presenti una spiccata preferenza per le linee di coltura cellulari aviarie; l'isolamento virale è stato infatti possibile in diverse linee cellulari aviarie ma non in quelle di mammifero. Si è inoltre notato che la replicazione di ABV non riguardi esclusivamente le cellule neuronali, come avviene per BDV, ma che interessi un'ampio spettro di linee cellulari con estesa diffusione a organi e tessuti (cuore, fegato, tubo digerente, rene oltre che nel sistema nervoso centrale). Questi risultati possono suggerire ABV come un patogeno virale selettivo per la specie aviarie in cui la trasmissione naturale avvenga tramite contatto fecale per via oro-nasale da uccello a uccello (Rinder M. *et al* 2009), e quindi scalfisce in parte l'ipotesi di questa specie come possibili *reservoirs*.

1.3.2 SPETTRO D'OSPITE

Il virus colpisce naturalmente cavalli e pecore, ma anche, meno frequentemente, altri equidi, bovini, capre, conigli, daini, camosci, lama, alpaca, gatti, cani, ratti, topi, gerbilli, procioni, struzzi, animali degli zoo, scimmie rhesus, uccelli (Hagiwara K. *et al* 2009; Jacobsen B. *et al* 2010; Kinnunen M. *et al* 2007; Nakamura J. *et al* 1998; Staeheli P. *et al* 2000) e sperimentalmente molti altri mammiferi. Molto probabilmente può infettare tutti gli

animali a sangue caldo, incluso l'uomo. *In vitro* BDV può infettare un amplissimo spettro di linee cellulari provenienti da specie animali differenti (Bode L. & Ludwig H. 2003).

Gli studi epidemiologici condotti sino ad oggi hanno interessato prevalentemente le popolazioni equina ed umana, ed in entrambi i casi hanno evidenziato come la sieropositività sia largamente diffusa anche tra i soggetti clinicamente sani. Anticorpi specifici per BDV sono stati cercati e trovati, sia in sieri equini che umani, in nazioni al di fuori dell' Europa centrale (Francia, Polonia, Svezia), oltre che al di fuori dell'Europa stessa (Israele, Giappone, Taiwan, Iran, Stati Uniti). La patologia emerge a livello clinico soprattutto, ma non esclusivamente, nel periodo compreso tra l'inizio della primavera e l'inizio dell' estate, e ne risultano colpiti per lo più i cavalli ospitati in strutture igienicamente non impeccabili, per esempio in fattorie ove alloggiano altre specie di animali, piuttosto che in scuderie specializzate. In alcuni alloggiamenti è stato possibile osservare ripetuti focolai di BD nel corso di più anni, ma è possibile osservare anche numerosi soggetti appartenenti alla stessa struttura che manifestano sintomi di BD nell'arco di pochi mesi. Di fatto gli studi epidemiologici sulla specie equina non sono realizzabili in maniera agevole, a causa della tendenza ai frequenti spostamenti, intrinseca alla specie, in occasione di fiere, concorsi e manifestazioni sportive. Indagini siero-epidemiologiche condotte su popolazioni equine di molti paesi (Germania, Giappone, Turchia, Iran, Svezia, Cina, Bangladesh, USA, Australia, Italia), con differenti tecniche diagnostiche, hanno permesso di evidenziare valori di prevalenza simili: un valore di siero-prevalenza medio in soggetti apparentemente sani, risulta generalmente compreso tra il 20 e il 40%, ad eccezione di alcune aree della Germania dove sale al 60%. Non sono mai state registrate predisposizioni di età, mentre in più studi è emersa una maggior siero prevalenza in femmine trottatrici e maschi Purosangue Arabi rispetto ad altri cavalli, inoltre è stata segnalata una maggior prevalenza nelle femmine rispetto ai maschi sia interi che castrati (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Da questi valori si discosta di molto l'Australia, dove BD non può essere considerato endemico nella popolazione equina, dal momento che la siero-prevalenza si attesta su valori inferiori al 5% (Kamhieh S. *et al* 2005). E' però interessante notare che la siero-prevalenza umana risulta invece dell'ordine del 30% (Bode L. & Ludwig H. 2003).

Una precisazione deve essere fatta per le popolazioni equine "chiuse", selvatiche o semiselvatiche, che quindi non vengono sottoposte al *management* tipico dei cavalli

domestici. Un gruppo di ricerca giapponese ha condotto uno studio di siero-prevalenza su di una popolazione equina autoctona di cavalli selvatici che vivono su pascoli liberi della regione sudorientale di Kyushu, in Giappone. I cavalli entrano in contatto con gli uomini solo una volta l'anno per i trattamenti sanitari stabiliti e per il censimento, con un *management* simile a quello a cui sono sottoposti i cavallini della Giara della Sardegna. I cavalli giapponesi hanno mostrato una siero prevalenza del 20%, in linea quindi con quella generale, mentre per i cavallini della Giara la siero-prevalenza era nettamente inferiore alle medie mondiali, 4.4% (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Come già detto in precedenza BD non è strettamente limitato a cavalli e pecore, anche se la frequenza con la quale la malattia si mostra nelle altre specie sembra essere molto più bassa.

Per la specie ovina, ormai legata storicamente alle manifestazioni cliniche di BD al pari di quella equina, uno studio longitudinale che ha seguito per tre anni un gruppo di 25 pecore in aree endemiche per BDV(regioni del sud-est della Germania), monitorando sia gli anticorpi nel siero, sia la presenza di RNA nel sangue periferico, ha evidenziato una positività del 12.5 (1°anno), 11.5 (2° anno), e 19. 4% (3°anno) in relazione alla ricerca anticorpale, e 1.6 (1° anno), 0 (2°anno), e 14.9% (3°anno) per quella relativa all'RNA. Lo studio inoltre ha riconfermato la stagionalità della manifestazione clinica, come già da tempo dimostrata, nei mesi primaverili e in inizio estate. I soggetti persistentemente infetti hanno mostrato l'eliminazione virale attraverso le secrezioni nasali, salivari e congiuntivali, ma non attraverso le urine. L'allontanamento dei soggetti positivi dal gregge non ha comunque ridotto, nell'anno seguente, la prevalenza di infezione per BDV (Vahlenkamp T. *et al* 2002).

BDV è stato trovato in asini, capre e bovini che presentavano sintomi neurologici e forti infiltrazioni linfocitarie nel sistema nervoso centrale. Alcuni dei bovini malati provenivano da aziende in regioni della Germania in cui BD non è endemica in cavalli e pecore. I pochi studi di siero-epidemiologia condotti sui bovini mostrano una prevalenza di infezione estremamente varia nelle diverse regioni, si passa da sieropositività prossime al 50 %, a segnalazioni prossime allo zero (Bode L. & Ludwig H. 2003; Hagiwara K. *et al* 2001).

Antigene e virus di BDV sono stati ritrovati nel sistema nervoso centrale di due conigli con malattia neurologica che provenivano dalla regione endemica della Svizzera, inoltre una

precedente relazione descriveva l'isolamento di BDV dal cervello di un coniglio con malattia neurologica (Staehele P. *et al* 2000).

Antigene e RNA di BDV sono stati ancora trovati nell'encefalo di animali da zoo di Turingia e Germania, che mostravano malattie neurologiche. Struzzi che presentavano un quadro di paresi a carico degli arti inferiori in Israele sono stati testati sierologicamente per BDV presentando positività per esso, ma dato che non sono state eseguite analisi istologiche e immuno-istochimiche, questi risultati sono piuttosto preliminari e devono essere considerati con cautela, anche prendendo in considerazione un'eventuale infezione da ABV in tale specie (Staehele P. *et al* 2000).

Altri lavori hanno dimostrato l'antigene e l'RNA di BDV nel sistema nervoso centrale di un cane con grave infiammazione encefalica e sintomatologia neurologica che aveva vissuto in una zona endemica in Austria e hanno dimostrato l'infezione naturale nei canidi. RNA virale è stato anche diagnosticato mediante PCR in alcune volpi (Staehele P. *et al* 2000).

Staehele *et al* (2000) hanno riportato un caso di meningoencefalite non suppurativa simile a quella da BD equina in una lince. Prove di immuno-istochimica risultarono positive per l'antigene di BDV. Il sequenziamento di un frammento BDV p24 amplificato mediante RT-PCR dall'encefalo di questo animale differiva di oltre il 2% dai ceppi noti per BDV.

Uno studio recente descrive BDV in due alpaca maschi, originari della Baviera, che presentavano soppressione sessuale cronica ed episodi convulsivi ripetuti; la conferma diagnostica è stata effettuata tramite immuno-istochimica, ibridazione in situ e PCR; l'analisi della sequenza genetica ha inoltre rivelato un'omologia del 99% per il ceppo della Baviera (Jacobsen B. *et al* 2010).

In Giappone (Hokkaido), durante una campagna di controllo, sono stati catturati e sottoposti ad eutanasia 549 procioni. Testati per la ricerca sierologica di BDV attraverso Elisa, confermata poi con RT-PCR, hanno mostrato una positività del 2%, di cui il 72.7% era formato da soggetti maschi. Dalla comparazione della sequenze genetiche con quelle di altre specie animali si è nuovamente confermata l'elevata omologia (dall'81.5-97.7%) (Hagiwara K. *et al* 2009).

Per quanto riguarda BDV nei felini la sua presenza è stata segnalata in numerose nazioni: Germania, Svezia, Regno Unito, Giappone, Turchia, con siero-prevalenze molto diverse;

l'età dei soggetti testati non risulta essere un fattore che influisce sulla sieroprevalenza, al contrario del sesso: è stato infatti chiaramente dimostrato come siano maggiormente colpiti i gatti maschi, ma questo probabilmente dipende dal comportamento aggressivo che potrebbe renderli più esposti all'infezione. Secondo alcuni autori i gatti selvatici o domestici che potevano avere contatti con l'esterno sono risultati meno colpiti rispetto a quelli strettamente domestici, in contrasto però con un altro studio nel quale gatti con accesso esterno hanno mostrato prevalenze di infezioni più alte. La differenza fra i due studi, oltre alle tecniche diagnostiche usate, sta nell'ambiente di provenienza dei gatti testati: nel primo caso una grande città, nel secondo un ambiente rurale. La prevalenza dei gruppi di gatti che presentavano altre patologie concomitanti risultano essere due-tre volte superiori rispetto gruppi di gatti sani. In particolare sembra esserci una correlazione positiva tra la sieropositività per FIV e BDV, ma lo stesso non si è visto per quanto concerne FeLV (Codazza D. & Nativi D. 2005; Nakamura J. *et al* 1999). Questo risultato ha comunque spinto molti autori a postulare un'azione di BDV come patogeno opportunisto, dato sostenuto anche dalla relazione positiva tra BDV umano e pazienti HIV positivi (Bode L. *et al* 1998; Cotto E. *et al* 2003). Sempre in considerazione a questo aspetto un altro lavoro ha dimostrato che esiste una maggior siero prevalenza umana (13-14%) in pazienti con malattie croniche progressive del sistema nervoso centrale e del sistema immunitario, rispetto a soggetti sani (2%) (Bode L. *et al* 1992).

La questione se BDV induca o sia correlato alla *staggering disease* (malattia barcollante) dei gatti risulta ancora poco chiara. Dalle prime relazioni è emerso che un' elevata percentuale (44%) di gatti svedesi affetti da questa patologia presentava anticorpi nel siero per BDV, però all'esame immuno-istochimico dell'encefalo solo tre dei 24 gatti malati presentava espressione dei marcatori virali. Al contrario, gatti con *staggering disease* in Austria sono stati segnalati privi di livelli rilevabili di marcatori BDV nel SNC. Una relazione del Giappone ha mostrato che bassi livelli di antigeni specifici per BDV e RNA erano presenti nel cervello di un gatto con infiammazione del SNC e sintomi neurologici non correlabili a tale sindrome. In un altro studio svizzero, solo uno dei 180 encefali di gatti con sindrome da *staggering disease* ha confermato l'infezione da BDV con l'immuno-istochimica, gli altri 179 sono risultati negativi per immuno-istochimica e RT-PCR. Un altro studio ha invece confermato positività per BDV in un gatto che presentava paralisi senza però presentare caratteri di infiammazione del SNC. L'acido nucleico virale, che è stato amplificato mediante RT-PCR dal tessuto cerebrale, ha mostrato il classico genotipo

europeo, strettamente collegato per il ceppo He/80. Infine, RNA specifico per BDV è stato trovato con RT-PCR nell'encefalo di alcuni gatti malati nel Regno Unito, ma l'infezione da BDV di questi animali non è stato confermato con altri metodi. Un'interpretazione conservatrice di questi risultati può concludere che, nonostante varie infezioni naturali di BDV nei gatti si possano occasionalmente verificare, questo virus non sia probabilmente l'agente eziologico della malattia da *staggering disease* (Staehele P. *et al* 2000).

I virus patogeni per la specie aviarie si classificano a parte come ABV. Anche in questi animali sono stati fatti diversi studi di ricerca virale, in particolare si è cercato di stabilire se esista o meno una correlazione con la malattia di dilatazione proventricolare (PDD). Tre diversi studi confermano l'esistenza di una elevata positività per ABV negli uccelli colpiti da PDD (positività che va dal 90 al 100%) e l'assenza di ABV in soggetti clinicamente sani (Kistler A. *et al* 2008; Villanueva I. *et al* 2009; Weissenböck H. *et al* 2009). In controtendenza invece i risultati ottenuti da Rinder *et al* (2009): su 13 volatili affetti da PDD solo 6 sono stati confermati per ABV. Tuttavia secondo gli stessi autori esiste la possibilità che la diagnostica non sia stata effettuata correttamente e che possano comunque esistere altri genotipi per ABV non ancora conosciuti e quindi non rilevabili con le metodiche attuali. Dall'analisi filogenetica, eseguita in tutti gli studi, emerge una maggior prevalenza di ABV-2 e ABV-4, mostrando inoltre un'omologia di sequenza per campioni raccolti in Europa, Stati Uniti, Israele ed Australia. Come già osservato per BDV, ABV non risulta avere caratteristiche di specie-specificità ne sono riconoscibili ad oggi *marker* geografici (Weissenböck H. *et al* 2009).

1.3.3 VIA DI TRASMISSIONE

A lungo è stato ritenuto valido l'assunto che la trasmissione fosse principalmente di tipo orizzontale: il virus verrebbe eliminato da un organismo infetto attraverso secreti ed escreti, quali saliva, secrezioni nasali e congiuntivali, e la trasmissione avverrebbe per contatto diretto, oppure attraverso l'assunzione di acqua o cibo contaminato da urine di possibili animali serbatoio (Codazza D. & Nativi D. 2005). L'RNA virale è stato rilevato in secrezioni nasali e lacrimali e nella saliva di una piccola frazione di animali sintomatici e nei medesimi secreti di cavalli sani ma sieropositivi (Richt J. & Rott R. 2001). La via intranasale è la più accreditata tra le possibili vie di trasmissione orizzontale, poiché risulta particolarmente facile e veloce l'accesso virale al sistema nervoso centrale, seguendo gli assoni del nervo olfattorio (Sauder C. & Staehele P. 2003). Studi di infezione sperimentale

nei ratti dimostrano come l'inoculazione per via intranasale porti lo sviluppo della malattia in circa 20 giorni, se l'inoculazione viene praticata nei cuscinetti plantari posteriori in 50-60 giorni, mentre se si usa una via endovenosa o attraverso gli arti posteriori di soggetti nevretozzati l'infezione non si manifesta (Carbone K. *et al* 1987). Tuttavia è necessario precisare che la trasmissione orizzontale non è mai stata sperimentalmente provata (Codazza D. & Nativi D. 2005).

In un caso di infezione naturale è però stata documentata la trasmissione verticale da una giumenta al suo redo. La giumenta in questione è stata sottoposta ad eutanasia dopo la comparsa di sintomatologia nervosa riconducibile a malattia di Borna. Sono stati ricercati anticorpi anti-BDV nel siero e nel liquido cerebrospinale della madre e nel feto mediante Western blot e sono state fatte ricerche di RNA-BDV con RT-PCR su encefalo e su cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC). In entrambi, ed è stata eseguita un'analisi istologica ed immunoistochimica sul tessuto cerebrale. Il siero e il liquor della madre sono risultati positivi, mentre il feto era negativo, la RT-PCR su encefalo e per PBMC è invece risultata positiva per entrambi, inoltre l'istologia cerebrale materna presentava le lesioni infiammatorie caratteristiche per BDV (Hagiwara K. *et al* 2000; Watanabe Y. *et al* 2007). È stato anche dimostrato come possano essere trasmessi anticorpi attraverso il colostro, almeno nella specie ovina (Vahlenkamp T. *et al* 2002), per cui bisognerebbe escludere dalle indagini sierologiche soggetti con età inferiore ai tre mesi. Nel medesimo studio si vide però che seguendo 15 agnelli, nati da madri infette, dopo oltre i tre mesi di età, solo un soggetto presentava anticorpi anti-BDV. Questa osservazione lascia supporre che la via di trasmissione verticale, almeno nella specie ovina, sia poco frequente. Alcuni autori però sono del parere che i sieri di animali nati da madri infette da BDV potrebbero essere sieronegativi nei primi mesi, nel caso in cui il patogeno venga trasmesso al feto nel tardo periodo di gestazione se non addirittura al momento del parto. Alcuni quindi sostengono che la via di trasmissione più comune sia quella verticale e che si verificherebbe negli ultimi tre mesi di gravidanza. Di fatto le vie di trasmissione del virus non sono state del tutto chiarite. Inoltre la presenza del virus nel sangue periferico, legato ai polimorfonucleati, ad anticorpi a formare immunocomplessi o libero, non è compatibile con una infezione strettamente neurotrofica ma lascia supporre che l'infezione da BDV possa presentarsi in differenti forme, tra le quali appunto la forma associata a cellule ematopoietiche (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Osservazioni epidemiologiche più approfondite in campo veterinario sono state condotte sulla specie equina. La patologia emerge a livello clinico soprattutto, ma non esclusivamente, nel periodo compreso tra l' inizio della primavera e l' inizio dell' estate, e ne risultano colpiti soprattutto i cavalli ospitati in strutture igienicamente non impeccabili, per esempio in fattorie ove alloggiavano altre specie di animali, piuttosto che in scuderie specializzate. La periodicità e la mancanza d' igiene, unitamente all' assenza di mutazioni specie-specifiche nel genoma, fanno supporre l' esistenza di un unico serbatoio (Codazza D. & Nativi D. 2005). I dati epidemiologici attualmente in possesso fanno pensare ad una o più specie di insettivori, in particolare un toporagno bicolore (*Crocidura leucodon*) che vive nelle aree agricole e si nutre di lumache, insetti e foraggi. Un recente studio condotto tramite la cattura di 8 talpe, 3 toporagni e 87 topi di diversa specie (catturate tra il 1999 e 2003 in un villaggio Svizzero endemico per BDV) ha rilevato la presenza di BDV nell' encefalo di tutti i toporagni sottoposti a controllo (n:3) ma in nessuno degli altri soggetti esaminati (attraverso IHC verso p24 e p38/40). Dall' esame della sequenza genetica è emersa una similitudine del 99.9% simile a quella di BDV proveniente da due cavalli morti per BDV nell' analoga regione. Si è quindi potuto ipotizzare che tali toporagni possano fungere da serbatoi, i quali trasmetterebbero il virus attraverso urina e/o saliva che contaminerebbe i foraggi. Il foraggio così contaminato utilizzato per alimentare cavalli e ovini favorirebbe l' infezione virale che potrebbe avvenire attraverso il nervo olfattorio od il trigemino. Essendo questa ipotesi ad oggi non ancora avvalorata scientificamente, non è da escludere però un differente ciclo epidemiologico anche legato all' esistenza di differenti serbatoi (Hilbe M. *et al.*, 2006). Anche gli artropodi vengono citati come potenziali vettori virali, anche se BDV non è mai stato isolato da insetti, almeno in Europa. Le zecche, e si pensa soprattutto alla specie *Hyalomma truncatum*, sono vettori nei paesi dell' Est Europeo di encefalomieliti equine sovrapponibili alla BD. Altri autori suggeriscono la possibilità che siano coinvolti nella trasmissione della malattia degli uccelli selvatici migratori. Recentemente è stata dimostrata la presenza di materiale genetico di BDV nelle feci di uccelli migratori (anatre e cornacchie sane), dimostrando che tali uccelli possano essere portatori asintomatici del virus. Il coinvolgimento di uccelli migratori viene postulato, sebbene non provato, anche da autori israeliani, che hanno notato come la distribuzione di sieropositività nella specie equina sul territorio nazionale sia sensibilmente più elevata nelle aree in corrispondenza delle rotte di migrazione, parallelamente a quanto avviene per le encefalomieliti virali (Codazza D. & Nativi D. 2005). C'è però da ricordare che la recente formazione del genere ABV e l' individuazione di elevate differenze con BDV

hanno portato a pronunciarsi sulla non possibilità di ABV nell'essere ritenuto agente virale per i mammiferi e quindi cadrebbe il concetto di serbatoio degli uccelli per le altre specie (Rinder M. *et al* 2009; Weissenbock K. *et al* 2009).

Di opinione diversa restano altri autori, più cauti nel pronunciarsi sui *reservoirs*, secondo i quali lo spettro d'ospite ampio e il fatto che la maggior parte delle infezioni di BDV rimane subclinica sembrano suggerire che vi sia una circolazione virale intra-specifica piuttosto che esistano serbatoi specifici o vettori che agiscano come fonte di infezione. In quest'ottica sarebbero gli stessi cavalli a fungere da serbatoio per il virus, poiché essi rimangono sieropositivi per anni pur non manifestando una chiara sintomatologia a livello clinico. Il virus della malattia di Borna, può causare l'infezione persistente del sistema nervoso centrale. La riattivazione virale può essere innescata da diversi stimoli: cambiamenti del sistema immunitario (immunosoppressione), fattori di stress, superinfezione da virus o altri traumi. Questi cavalli sarebbero quindi soggetti a manifestare delle sottili alterazioni comportamentali quando fattori stressanti vari o malattie concomitanti abbassano transitoriamente le loro difese immunitarie (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Antigeni virali (Ag), anticorpi (Ab), immunocomplessi circolanti (CIC) e RNA, possono essere isolati dal tessuto cerebrale, dal liquido cerebrospinale e dal siero. Dopo l'attivazione di infezione latente è possibile rilevare gli Ag. Nella seconda fase della viremia acuta, gli Ag si legano con Ab e formano i CIC. Originariamente per la diagnosi di infezione da BDV sono stati rilevati solo gli Ab virali, ma il riscontro positivo per essi significa che l'organismo è stato in contatto con BDV ma non implica necessariamente un'infezione attiva. Grazie allo sviluppo di tecniche diagnostiche quali ELISA verso CIC, Ag e Ab è possibile valutare lo stadio dell'infezione in cui si trova il soggetto.

Da quanto esposto fino ad ora appare chiaro come siano ancora molti i punti non chiari nell'epidemiologia di BD; ad esempio non è chiaro perché BD sia rimasto per secoli confinato in aree endemiche ben delimitate del centro Europa, nonostante non siano mai state applicate misure restrittive nella movimentazione degli animali, né è stato ancora chiarito il ruolo di possibili serbatoi. L'unica cosa che appare certa è che la diffusione di BDV sia più ampia di quanto si potesse pensare in passato, sebbene ancora una volta non sia chiaro se ciò sia da imputare ad una reale maggior diffusione del virus o piuttosto, più probabilmente, ad un aumento di interesse verso tale malattia e al conseguente impiego di tecniche diagnostiche più avanzate e precise (Codazza D. & Nativi D. 2005).

1.4 PATOGENESI

1.4.1 NEUROINVASIONE E PROPAGAZIONE

La via di penetrazione più probabile del virus nell'organismo sembra essere il neuro epitelio olfattorio. E' stata dimostrata in laboratorio in diverse specie, sebbene sperimentalmente sia possibile riprodurre l'infezione anche per via intracerebrale, intraperitoneale, intraneurale, sottocutanea e perfino per via intestinale (Carbone K. *et al* 1987; Katz J. *et al* 1998; Sauder C. *et al* 2003).

Una volta penetrato nell'organismo, il virus procederebbe per via intra-assonale a partire dalle terminazioni del nervo olfattorio, o del trigemino, fino a raggiungere il sistema nervoso centrale, dove si replica nei neuroni e nelle cellule della glia (preferenzialmente nel sistema limbico) per poi estendersi al sistema nervoso periferico e alle cellule della retina (Richt J. & Rott R. 2001). Il meccanismo con cui BDV passi da un neurone all'altro nello spazio sinaptico non è tutt'ora stato chiarito; alcuni ritengono che questo avvenga per captazione delle nuove particelle virali rilasciate nello spazio sinaptico, dopo un ciclo di replicazione completo, (Codazza D. & Nativi D. 2005) altri autori però, sostengono l'ipotesi secondo la quale solo il materiale genetico del virus, probabilmente sotto forma di RNA o ribonucleoproteine (RNP), attraversi le sinapsi per propagarsi poi nel SNC ancora in forma incompleta, spiegando così la sua impercettibilità morfologica in tali tessuti (Bajramovic J. *et al* 2003; Castrucci G. 2002; Gosztonyi G. *et al* 2005).

La diffusione avviene per via retrograda, sempre via assoni, e il virus si localizza nelle terminazioni periferiche dei nervi in seno a diversi organi: milza, parotide, polmone, cuore, reni, vescica, ovaie, nonché, essendo stato ritrovato nelle secrezioni salivari, congiuntivali e lacrimali, anche nelle ghiandole esocrine. La patologia è causata dalla reazione del sistema immunitario nei confronti del patogeno con lo sviluppo della conseguente encefalomielite linfocitaria disseminata, che provoca la distruzione dei neuroni e l'idrocefalia conseguente; difatti la comparsa dei sintomi clinici avviene in coincidenza con lo sviluppo della reazione infiammatoria. A prova di ciò, animali immunodepressi o immunosoppressi sperimentalmente non manifestano la malattia e le lesioni caratteristiche a dispetto dell'attività replicativa del virus nel tessuto nervoso (Castrucci G. 2002; Richt J. & Rott R. 2001). In corso di infezioni sperimentali si è inoltre potuto chiarire come la reazione infiammatoria avvenga soprattutto per intervento della risposta immunitaria

cellulo mediata, piuttosto che di quella umorale. Sia i linfociti T CD4+ che i CD8+ sono presenti negli infiltrati del SNC e contribuiscono allo sviluppo della reazione infiammatoria (Planz O. *et al* 1995). Indagini condotte *post mortem* su tessuti cerebrali di pecore infette hanno mostrato come linfociti CD4+ e CD8+ siano presenti sia negli infiltrati perivascolari che parenchimali che meningei (Vahlenkamp T. *et al* 2002). In genere i CD4+ sono in numero maggiore rispetto i CD8+ negli infiltrati perivascolari, mentre accade il contrario negli infiltrati parenchimali; linfociti B e macrofagi sono invece presenti in minor misura (Sobbe M. *et al* 1997). Le cellule T CD8+ sono le responsabili della distruzione delle cellule cerebrali infette dal virus, mentre i T CD4+ hanno un ruolo di supporto per le TDC8+ e per la produzione di anticorpi antivirali (Furrer E. *et al* 2001). La eliminazione delle cellule CD8+ o il loro blocco di funzione, ha come risultato la prevenzione dell'insorgenza delle manifestazioni neurologiche e delle alterazioni istopatologiche (Castrucci G. 2002). La competenza del sistema immunitario influenza la possibilità della malattia di emergere sul piano clinico, ma non la capacità del virus di diffondersi nei vari tessuti dell'organismo, che pare invece essere correlata all'età del soggetto al momento dell'infezione. Nei soggetti neonati, il virus non si limita al tessuto nervoso ma si diffonde in breve tempo a tutto l'organismo; ratti neonati infettati sperimentalmente, pur non presentando la reazione infiammatoria e la sintomatologia nervosa dei soggetti adulti, sviluppano un' infezione che persiste per tutta la vita del soggetto caratterizzata da una mancata risposta immunitaria cellulo-mediata, ma evidenziano delle alterazioni del SNC quali: riduzione della corteccia, ipoplasia cerebellare, degenerazioni dei neuroni del giro dentato e delle cellule del *Purkinje* del cervelletto; queste sono probabilmente le conseguenze della capacità di BDV di indurre danni al flusso assoplasmatico e sinaptico, con conseguente diminuzione del traffico interneurale di fattori di crescita necessari per un corretto mantenimento e funzionamento neuronale. Questa condizione viene definita come "*persistent, tollerant infection of the newborn*" (PTI-NB) rats. Tali soggetti crescono meno del normale e mostrano deficit cognitivi ed emozionali (Gonzalez D. *et al* 2000; Pletnikov M. *et al* 1999). Quindi l'infezione da BDV interferisce con il processo evolutivo di determinate aree del SNC particolarmente coinvolte nel meccanismo di maturazione post-natale; in particolare contrasta la principale funzione delle cellule del *Purkinje* che è quella di favorire la moltiplicazione, la maturazione e la migrazione delle cellule granulari. D'altra parte, gli astrociti designano le modalità di migrazione delle suddette cellule oltre ad esplicitare un'azione immunoprotettiva a favore delle cellule del *Purkinje*. Pertanto, l'intesa astrocitosi riscontrabile nei ratti PTI-NB potrebbe essere coinvolta nel fenomeno che

provoca il blocco della migrazione delle cellule granulari. Nell'ippocampo dei ratti PTI-NB è sempre presente la concentrazione più elevata del virus, tuttavia questo non interferisce con la normale vitalità dei neuroni, con la sola eccezione della circonvoluzione dentata dell'ippocampo i cui neuroni subiscono un progressivo processo degenerativo. La maggioranza delle cellule granulari presenti nella circonvoluzione dentata dell'ippocampo viene prodotta dopo la nascita e la neurogenesi in questa particolare area evolve in età adulta (Castrucci G. 2002; Mayer D. *et al* 2005; Pletnikov M. 1999). Queste osservazioni ci possono spiegare casi come quello rinvenuto in un gatto, infettato naturalmente, che presentava una forma clinica anomala con fascicolazioni muscolari e assenza delle caratteristiche lesioni del SNC sebbene il genoma virale per BDV fosse stato rilevato nei neuroni; secondo gli autori sarebbe un caso di infezione intrauterina o perinatale (Codazza D. & Nativi D. 2005). Alcuni studi dimostrano che un sistema umorale efficiente sembra comunque non essere in grado di neutralizzare la progressione del virus e la sua ripercussione clinica, poiché sono stati rilevati nel *liquor* anticorpi specifici in presenza di BDV sintomatica, ma altri autori hanno dimostrato come il trasferimento di immunità passiva mediante inoculo di anticorpi anti BDV in *Lewis rats* immunocompromessi (dove la diffusione del virus riguarda oltre che il SNC anche tessuti extra-nervosi) abbia impedito la diffusione del virus in tessuti al di fuori del SNC; ricordiamo che soggetti della stessa specie immunocompetenti presentano invece diffusione solo nel SNC; da ciò si evince che lo sviluppo di immunità umorale possa rivestire un ruolo di rilievo nella diffusione del virus nell'organismo (Stitz L. *et al* 1998). In corso di infezione naturale gli anticorpi sono generalmente a basso titolo e non sono presenti per tutta la durata della vita dell'animale (Durrwald R. & Ludwig H. 1997); sono riscontrabili periodi in cui gli anticorpi non risultano rilevabili e altri in cui il loro livello sale, questo in relazione con l'espressione del genoma virale, a sua volta subordinato a fattori sia genetici che fisiologici che ambientali (stress, altre patologie, concorsi sportivi etc). Nei soggetti acuti di BD, la ricerca anticorpale porta a risultati positivi nella totalità dei soggetti colpiti, mentre nei casi iperacuti non sempre si riescono ad isolare gli anticorpi verso BDV (Codazza D. & Nativi D. 2005); uno studio sperimentale condotto su tre pony, infettati per via intracerebrale, ha permesso di evidenziare come la sierconversione fosse osservabile, tra l'altro in forma modesta, solo nel soggetto che superava la malattia (gli altri due pony morivano a 28 e 30 giorni post inoculo) e comunque solo dopo comparsa dei segni clinici (Katz J. *et al* 1998). Ricordiamo che BDV è stato evidenziato anche nei polimorfonucleati circolanti, anche in soggetti sieronegativi (Vahelenkamp T. *et al* 2000); questo oltre a mettere in dubbio l'ipotesi che

BDV sia un virus strettamente neurotropo, in parte potrebbe giustificare dal punto di vista patogenetico il decorso clinico di alcune forme di infezione caratterizzate da periodi di infezione latente alternati a periodi di attivazione virale, riscontrate sia nei cavalli che nell'uomo. Pazienti psichiatrici alternano ripetutamente periodi di instabilità mentale a periodi di normalità. Studi longitudinali condotti sui cavalli hanno evidenziato una correlazione tra il manifestarsi della sintomatologia e l'espressione degli antigeni (N-p40 e P-p24) e la trascrizione dell'RNA virale nei polimorfonucleati del sangue. Questo, oltre a far supporre una correlazione del meccanismo patogenetico nella specie equina ed umana, evidenzerebbe la possibilità che la sintomatologia, in questi casi, più che da correlarsi alla reazione infiammatoria, sia legata ad un disturbo transitorio della neurotrasmissione, soprattutto a livello limbico. I periodi di attivazione potrebbero essere legati alla produzione di ribonucleoproteine (RNPs) virali, o solo proteine, che sarebbero responsabili di tale alterazioni; l'infezione coinvolgerebbe specifici percorsi neurotrasmettitori e la sua diffusione nell'ippocampo coinciderebbe con l'infezione di alcuni recettori aminoacidici, quali ad esempio il glutammato (Bode L. & Ludwig H. 2003; Castrucci G. 2002; Codazza D. & Nativi D. 2005). Alcuni autori riportano come l'infezione persistente del SNC da parte di BDV determini l'interessamento predominante degli astrociti con conseguente sviluppo di astrocitosi; considerando che essi rivestono un ruolo essenziale nel mantenimento di un microambiente necessario per una corretta funzionalità neuronale, se colpiti da infezione si influenza negativamente la loro capacità di catturare il glutammato, il principale neurotrasmettitore eccitatorio del SNC, e quindi qualunque disturbo di questo delicato sistema-glutammato sarebbe in grado di influenzare negativamente l'intero sistema limbico dei neurotrasmettitori, (sistema che comprende anche serotonina, dopamina e noradrenalina). Tale meccanismo di interferenza non è ancora chiaro anche se è stata postulata l'esistenza di un fattore solubile sintetizzato e secreto dalle cellule infette (Codazza D. & Nativi D. 2005; Gosztonyi G. & Ludwig H. 1995). Livelli eccessivi di glutammato extracellulare, inoltre, possono causare tossicità e morte neuronale. BDV sembra avere un'affinità particolare per le regioni encefaliche ricche di recettori per l'aspartato e il glutammato, e questo non fa che supportare l'ipotesi del coinvolgimento del sistema glutammato nell'insorgenza di disturbi neurologici reversibili, ascrivibili in misura maggiore alla sfera comportamentale. Anche il sistema dopaminergico sembra essere coinvolto, soprattutto nelle fasi iniziali della patologia, e, nei ratti neonati si è visto interessare anche i sistemi serotoninergici e noradrenergici (Codazza D. & Nativi D. 2005). Come già accennato gli astrociti sono essenziali per i neuroni in quanto presiedono

al meccanismo che ne regola la migrazione nel corso dello sviluppo cerebrale e unitamente ad essi partecipano alla organizzazione delle diverse funzioni cerebrali; gli astrociti, inoltre, sono coinvolti nel meccanismo che regola l'eliminazione delle neurotossine e la produzione delle citochine che possono agire come fattori di differenziazione e come modulatori delle espressioni genetiche dei neuroni. Nel cervelletto e nell'ippocampo dei ratti PTI-NB viene osservato un supercontrollo delle citochine IL-1 alfa e beta, IL-6 e del fattore alfa della necrosi, responsabili del processo infiammatorio; nel cervello degli stessi ratti non si osservano gli infiltrati di cellule immunitarie caratteristici ma solo una marcata astrocitosi. Altro reperto osservato nell'encefalo di ratti PTI-NB è costituito da un'aumentata produzione del fattore tissutale (TF) o recettore di trasmembrana, che nel SNC è prodotto dagli astrociti e che si identifica con il principale catalizzatore del processo enzimatico a cascata della coagulazione che sfocia nella formazione della trombina. La presenza di BDV è associata all'aumento dell'attività codificante del gene TF. Appare sempre più credibile l'ipotesi secondo cui le proteine della coagulazione e i sistemi connessi alla fibrinolisi possano avere, nel SNC, funzioni che prescindono dalla coagulazione del sangue, come quella di regolare il normale sviluppo del cervello e di preservarlo dai danni provocati da eventuali traumi. Le alterate attività delle proteasi possono contribuire alla comparsa di alterazioni di diverse patologie neurodegenerative, fra cui la malattia da *Alzheimer*. E' interessante osservare che la trombina è per lo più espressa dai neuroni dopaminergici del mesencefalo e ciò suggerisce la possibilità di una correlazione fra il controllo del fattore tissutale e le anomalie dopaminergiche osservate nella malattia di Borna nel ratto (Castrucci G. 2002).

1.5 SINTOMATOLOGIA

1.5.1 INFEZIONE NATURALE

Il peculiare comportamento del virus, e le osservazioni in merito alla sieroprevalenza, hanno permesso di giungere alla conclusione che la maggior parte dei soggetti sieropositivi non manifesta la malattia in alcun modo sul piano clinico. Solo quella che viene definita come "la punta dell' iceberg ", manifesta una sintomatologia variabile (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Uno studio che ha coinvolto più di 100 cavalli sani ma sieropositivi ha evidenziato che circa il 20% degli animali ha iniziato a manifestare sintomi neurologici entro un anno, portando un terzo di essi ad essere abbattuto. Sono stati inoltre esaminati gli encefali di sei animali sani (tre pecore, un cavallo, un asino e un mulo) provenienti da una stalla, dove un'epidemia locale di BD aveva portato a morte altri animali: anticorpi sierici per antigeni di BDV e una lieve encefalite è stata rinvenuta in tutti e sei i soggetti. Questi e altri studi stabiliscono la chiara esistenza di portatori asintomatici, almeno temporaneamente, nelle aziende agricole con casi sintomatologici sporadici di BD (Staeheli P. *et al* 2000).

La malattia può decorrere in tre forme: lievi alterazioni comportamentali alternate a dei periodi di normalità, grave malattia neurologica che generalmente si risolve con la morte dell' animale, oppure, nella maggior parte dei casi, infezione asintomatica. Tale suddivisione è nota nella specie più studiata, cioè quella equina, ma si può ritenere valida per l' intero spettro di ospiti. I portatori asintomatici sono anche eliminatori del virus attraverso escreti e secreti e potrebbero giocare un ruolo chiave nel mantenimento e nella diffusione dell' infezione. A tutt'oggi non è chiaro se la manifestazione clinica dell' infezione dipenda da fattori propri del virus (sierotipo, virulenza) piuttosto che da fattori propri del soggetto colpito, in particolare uno status immunitario deficitario e la genetica (cavalli Lipizzani). L'ipotesi secondo cui alcuni soggetti sarebbero geneticamente predisposti alla resistenza nei confronti del virus e altri no potrebbe giustificare anche la distribuzione geografica della BD clinica, che sembra essersi auto imposta delle barriere invisibili. E' stato osservato come nella stessa scuderia o allevamento alcuni soggetti manifestano la sintomatologia e altri no. E' stato ancora osservato come i cavalli atleti selezionati da secoli per un tipo particolare di attività mostrino, a parità di sieropositività, una percentuale più bassa di casi clinicamente manifesti. Queste osservazioni permettono di avanzare

l'ipotesi secondo cui la resistenza del singolo soggetto allo stress sia il fattore chiave nella possibilità di emergenza della forma clinica. In quest'ottica, dunque, i cavalli più resistenti alla forma clinica della BD sarebbero quelli che, per selezione naturale o di razza, hanno sviluppato la maggior capacità di resistenza allo stress. Il periodo di incubazione per gli equini colpiti da infezione naturale può variare da 2 settimane a diversi mesi. La sintomatologia non è standard ma varia da soggetto a soggetto e nei cavalli coinvolge simultaneamente o in sequenza alterazioni del sensorio, della sensibilità, della motilità, della psiche e del funzionamento del sistema nervoso autonomo (SNA). Tra i sintomi più frequenti nella fase iniziale ricordiamo depressione, apatia, sonnolenza, facies stuporosa. L'evoluzione della malattia e il quadro sintomatologico dipendono in larga misura dall'estensione della reazione infiammatoria e dalle aree cerebrali colpite. In generale si può affermare che l'evoluzione della malattia avviene in circa tre settimane e che la morte segue in un numero di casi compreso tra 80 e 100%. Così, all'inizio della malattia si possono osservare alterazioni comportamentali: il soggetto mangia lentamente, si ferma all'improvviso mentre mastica e "fa tabacco", oppure compie movimenti masticatori a vuoto interrotti da frequenti sbadigli, e ancora spinge la testa contro un muro. Sempre nelle fasi iniziali può essere presente febbre ricorrente che resiste ai trattamenti farmacologici e protrusione del pene in assenza di minzione. Ancora si possono osservare movimenti ripetuti, letargia, sonnolenza, ipereccitabilità, paura, reazioni di aggressività a stimoli usuali. Le alterazioni comportamentali sono da riferire al danno funzionale del sistema limbico, sede di elezione della replicazione del virus. Sempre nelle fasi iniziali è possibile osservare ipocinesia, posture anomale, minore sensibilità cutanea e profonda, che risultano in una inadeguata risposta agli stimoli esogeni, nocicettivi e non, e perdita della propriocezione. Negli stadi avanzati della malattia diminuisce la risposta ai riflessi spinali e vengono compiuti movimenti ritmici ripetitivi con la testa, ipoestesia, atassia, disturbi dell'equilibrio, posture anormali. A seconda dell'interessamento dei nervi cranici si può avere anche disfagia, scialorrea (V nervo), diminuita tensione della lingua, aumento dei movimenti della lingua stessa (XII nervo), bruxismo e trisma mandibolare (V e VII nervo), paresi del facciale (Fig.11), nistagmo (III, IV, V, VI nervo), strabismo e miosi (III nervo). Negli stadi finali può comparire un torcicollo neurogeno, in taluni casi associato a movimenti di camminata ossessiva in circolo o movimenti "a orologio", detto anche "ballo dell'orso". Frequentemente i soggetti presentano anche convulsioni, in genere precedute da lievi tremori dei muscoli della testa, e costantemente accompagnate da un atteggiamento di pressione della testa contro pareti o altri oggetti, probabilmente dovuto

all' aumento della pressione nel liquido cerebrospinale nel sistema nervoso centrale interessato da risposta infiammatoria. Si nota comunemente la perdita del riflesso pupillare e la comparsa di strabismo, sintomi che generalmente precedono il coma (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Nelle forme acute di BD c' è sempre interessamento della retina e conseguente sviluppo di cecità. Studi morfologici del tessuto retinico di cavalli con Borna hanno evidenziato estese lesioni nella retina in tutti i cavalli colpiti (Dietzel J. *et al* 2007).



Fig.11 Cavallo affetto da infezione naturale da Borna: presenta postura anomala e paralisi del nervo facciale (Richt J. & Rott R. 2001).

Circa il 50% degli animali colpiti dalla forma acuta sviluppano un certo grado di incapacità ad ingerire cibo e bevande, la qual cosa può limitare la durata della patologia. Nelle fasi finali della sintomatologia i soggetti colpiti difficilmente sono in grado di assumere cibi e bevande, sicché sviluppano un certo di grado di iperbilirubinemia che causa colorazione itterica delle mucose. Sono stati descritti anche sintomi non neurologici, come pallore delle mucose, coliche ricorrenti e laminiti croniche senza apparente causa, ma ancora non è chiaro se tali sintomi siano direttamente causati dall' infezione col BDV. Uno studio giapponese ha messo in luce una differenza significativa tra la distribuzione dei disordini locomotori (tendinite del flessore superficiale, osteocondrosi cervicale, osteocondrite dissecante), tra soggetti sieropositivi e sieronegativi. I soggetti che sopravvivono alla fase acuta sviluppano alterazioni del comportamento, come sonnolenza e timore, idrocefalo, paresi, paraparesi e cecità permanente.

Dopo questa descrizione ci pare opportuno sottolineare l' estremo polimorfismo del quadro clinico. In presenza di sintomi neurologici le diagnosi differenziali da tenere presenti sono molte: infezione da EHV-1, rabbia, *tick-borne encephalitis*, altre encefaliti virali (West Nile disease, WEE, EEE, VEE), botulismo, tetano, meningiti batteriche, mieloencefaliti protozoarie e parassitarie, neoplasie, avvelenamenti, lesioni del sistema nervoso centrale, malformazioni congenite, intossicazioni anche da farmaci ed avvelenamenti. Particolare attenzione deve allora essere rivolta dagli acquirenti di cavalli, che devono essere in grado, in questo aiutati dal medico veterinario di fiducia, di valutare in modo differenziale gli anomali comportamenti degli equini sportivi che troppo spesso sono ricondotti alla somministrazione di sostanze ad attività stimolante (*doping*) o ad altre *noxae* patogene (Codazza D. & Nativi D. 2005; Richt J. & Rott R. 2001).

Nella pecora, altro ospite naturale, le manifestazioni cliniche sono riconducibili a *deficit* motorio seppure di entità minore rispetto al cavallo. Nelle fasi iniziali la sintomatologia è sovrapponibile a quella della *scrapie* (alterazioni comportamentali, l'animale si isola, smette di brucare senza ragioni apparenti, presenta iperestesia cutanea, atassia) ma la diagnosi differenziale è semplice: questa patologia evolve nell' arco di mesi, la BD invece nel giro di 4 -10 giorni porta la pecora a pigiare la testa contro i muri, a barcollare e digrignare i denti, l'andatura si rende difficoltosa e incerta con movimenti di maneggio fino al decubito laterale immobile o con movimenti di *pedalage*. La *scrapie* porta inevitabilmente a morte, la BD può risolversi da sé, residuando però delle alterazioni comportamentali o del movimento per tutta la vita dell' animale. Altre diagnosi differenziali di cui tenere conto sono la Listeriosi e l'infestazione da larve di *Oestrus ovis* (Codazza D. & Nativi D. 2005; Vahelenkamp T *et al.* 2002)

È interessante notare come la sintomatologia della BD nella specie bovina sia sovrapponibile a quella della BSE: alterazioni comportamentali, del sensorio e del movimento, anche se si ricordi che alcuni soggetti positivi al prione manifestano solo un calo delle produzioni. La diagnosi differenziale deve comunque sempre considerare anche altre infezioni virali e batteriche del SNC (encefaliti erpetiche, listeriosi, clamidiosi, meningiti batteriche) (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Nel cane si impone la diagnosi differenziale con il cimurro e la rabbia, i cui agenti eziologici sono virus appartenenti all' ordine dei *Mononegavirales* come il BDV.

Nel gatto si segnala la cosiddetta "*staggering disease*", ovvero una sindrome neurologica che racchiude in sé molteplici possibilità manifestative e molteplici cause, tra le quali solo di recente è stata annoverata anche la malattia di Borna. I felini colpiti manifestano barcollamento, atassia e paralisi, soprattutto a carico degli arti posteriori; altri sintomi osservati sono il cambiamento di comportamento, con miagolii più frequenti del normale, ansietà, depressione del sensorio, anoressia, iperestesia, ipersensibilità alla luce e al rumore. La maggior parte dei gatti muore nel giro di quattro settimane dall'esordio dei sintomi. E' stata descritta anche una forma clinica atipica con fascicolazioni muscolari e deficit propriocettivi. A differenza di quanto accade nella specie equina, l'espressione degli antigeni da parte del gatto è bassa.

Negli struzzi BDV è stato osservato solo una paresi degli arti, essendo in questa specie interessato dalla reazione infiammatoria il midollo spinale più che il SNC (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Per le specie aviarie, dove si parla di ABV, essendo rinvenuto solo in soggetti positivi per PDD, la sintomatologia è sovrapponibile a tale patologia: disfunzioni del tratto gastroenterico quali disfagia, rigurgito, cibo non digerito nelle feci, dilatazione del proventriglio e ventriglio, segni neurologici come atassia e disturbi della deambulazione (Rinder M. *et al* 2009; Weissenbock H. *et al* 2009).

Negli altri animali l' infezione naturale da BDV raramente si manifesta clinicamente, ma qualora si presentino i sintomi essi sono sempre riferibili ad alterazioni comportamentali, del sensorio, o del movimento. La sintomatologia è sempre e comunque poliforme e la possibilità della BD va tenuta sempre in considerazione, soprattutto se si manifesta in un' area endemica (Codazza D. & Nativi D. 2005).

1.5.2 INFEZIONE SPERIMENTALE

Numerose specie sono state utilizzate per indagini sperimentali. Alcune di esse meritano di essere ricordate per aver permesso il conseguimento di importanti acquisizioni sui meccanismi patogenetici.

Coniglio: viene per lo più inoculato per via intracerebrale, ma sono praticabili anche altre vie quali intranasale, intraneurale, sottocutanea, orale e intraperitoneale. Previa inoculazione per via intracerebrale, dopo un periodo di incubazione di 12-13 giorni,

compaiono sintomi di abbattimento, ipereccitabilità, diminuzione dell'appetito, dimagrimento e debolezza del treno posteriore, sonnolenza, depressione, movimenti di maneggio, paralisi fino al sopraggiungere della morte. Al tavolo anatomico è possibile osservare congestione ed edema più o meno marcato delle meningi. L'esame istologico mette in evidenza encefalite e mielite acuta, disseminata e non purulenta, con infiltrati linfocitari periva scolari, proliferazione della neuroglia e lesioni degenerative delle cellule gangliari. Possono essere evidenti i corpuscoli di *Joest-Degen* nel nucleo delle cellule gangliari. Nel sangue sono presenti anche anticorpi neutralizzanti e gammaglobuline di produzione locale nel liquor.

Topo: l'inoculazione per via intracerebrale provoca, sia nei neonati che nei soggetti adulti, una infezione persistente nel corso della quale il virus è dimostrabile nei neuroni, senza dar luogo a segni di malattia, ma stimolando la produzione di anticorpi specifici.

Scimmia: dopo 4-7 settimane dall'inoculazione, *Macacus rhesus* presenta una sindrome di tipo retinico-encefalico con presenza di virus nella retina e nel cervello (Castrucci G. 2002).

Ratto: *Lewis Rats* è sicuramente la specie di laboratorio più utilizzata e rappresenta un eccellente modello per lo studio di tale patologia. Anche nel ratto si ricorre preferenzialmente all'inoculazione intracerebrale. Un fattore particolarmente importante è legato all'età degli animali che può modificare completamente il comportamento della malattia. Il periodo di incubazione negli adulti è di 15-25 giorni, trascorsi i quali compaiono i segni di una encefalite necrotizzante autolimitante con mortalità variabile, caratterizzata da fenomeni infiammatori a livello retinico; la sintomatologia si presenta inizialmente con movimenti anomali, aggressività e iperattività, seguite da apatia e sonnolenza. Negli animali che non muoiono i fenomeni infiammatori e necrotici regrediscono in circa due mesi, ma persiste lo stato di apatia che si protrae a lungo, spesso accompagnato dallo sviluppo di obesità (nel 5-10% dei ratti) di origine ancora sconosciuta. Nei ratti neonati o nei soggetti immunocompromessi, l'infezione non induce né i sintomi né i fenomeni infiammatori riscontrati negli adulti; i ratti neonati infettati sperimentalmente non presentano la sintomatologia classica ma comunque manifestano alterazioni comportamentali rilevanti e un minor sviluppo di alcune aree encefaliche. Sia negli uni sia negli altri si ha una risposta anticorpale con produzione, in certe condizioni, anche di anticorpi neutralizzanti, che in nessun caso, peraltro, influenzano la persistenza e la

replicazione del virus nelle cellule nervose (Pletnikov M. *et al* 1999; Richt J. & Rott R. 2001; Sauder C. *et al* 2003; Stitz L. *et al* 1998).

La differenza sostanziale riscontrata con le infezioni naturali è la distribuzione delle lesioni, che nelle infezioni naturali è limitata a determinate aree mentre nelle infezioni sperimentali è più diffusa (Codazza D. & Nativi D. 2005). Alcuni autori comunque si mostrano critici verso l'interpretazione dei dati provenienti da infezioni sperimentali dei *Lewis rats*, sostenendo che i meccanismi patogenetici potrebbero essere differenti in corso di infezione naturale (Bode L. & Ludwig H. 2003).

1.6 LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

A livello patologico le infezioni sperimentali e naturali presentano caratteristiche sovrapponibili; le lesioni si riscontrano soprattutto a livello del SNC, in particolare a livello della sostanza grigia, nel midollo allungato e a livello retinico. Non si rilevano lesioni macroscopiche caratteristiche ma, sul piano istologico, si evidenzia una encefalomyelite acuta, disseminata e non purulenta, con modica degenerazione delle cellule gangliari, neuronofagia, iperproliferazione delle cellule astrocitarie e infiltrati linfocitari perivascolari (Fig.12), costituiti maggiormente da macrofagi, linfociti T (CD4+ e CD8+) e cellule del plasma. Nei neuroni, maggiormente a livello dell'ippocampo, si osserva la presenza di inclusi nucleari (inclusi di *Joest-Degen*: che si mostrano come una massa centrale circolare, compatta ed eosinofila, circondata da un alone chiaro, il tutto delimitato esternamente da una sottile linea scura) che se evidenti possono essere considerati patognomonici per BDV. Le lesioni prevalgono a livello della corteccia basale, del bulbo olfattorio, del nucleo caudato, del talamo, ippocampo e nelle aree periventricolari del midollo allungato; le alterazioni a livello del midollo spinale sono trascurabili, mentre sono assenti a livello del cervelletto (Gonzales D. *et al* 2000; Richt J. & e Rott R. 2001; Vahlenkamp T. *et al* 2002).

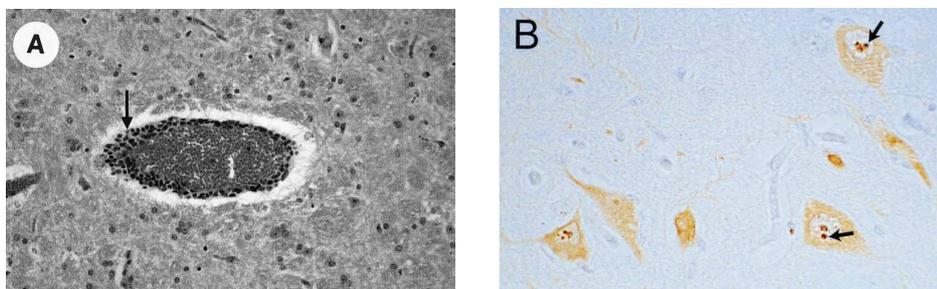


Fig.12 A: sezione in paraffina della corteccia frontale di pecora all'esame istologico con colorazione ematossilina-eosina: notare la modesta infiltrazione linfocitaria perivascolare (Vahlenkamp T. *et al* 2002 modificata). B: neuroni dell'ippocampo positivi per l'immunofluorescenza: si possono notare i numerosi inclusi di Joest-Degen (Nowotny N. *et al* 2000).

1.7 PROFILASSI E TERAPIA

Per BDV non sono mai stati pensati piani di eradicazione e, in base alle caratteristiche e alla diffusione del virus, risulta poco verosimile ipotizzarli per il futuro. In caso di BD clinicamente manifesto valgono le normali pratiche igieniche utilizzate verso virus con *envelope* tenendo presente che il virus viene inattivato dopo 30 minuti a 56°C e dopo due giorni a 37°C; resiste fino a tre settimane a 20°C e per anni a -70°C. E' sensibile all'azione dei raggi UV e viene inattivato a pH 3 dopo 30 minuti a 4°C. Disinfettanti quali candeggina, sali quaternari d'ammonio, amminoacidi ad alto peso molecolare sono validi contro tale virus). Quindi la rigida applicazione delle norme di profilassi sanitaria (disinfezione, derattizzazione e isolamento del soggetto colpito) assicurano la limitazione della propagazione e del contagio (Castrucci G. 2002).

All'inizio degli anni '80 in Germania venne impiegato un vaccino vivo attenuato ma la pratica venne sospesa nel '92 non solo avendone constatata la mancata efficacia, ma soprattutto a causa dell'insorgenza della patologia in alcuni dei soggetti vaccinati (Codazza D. & Nativi D. 2005). Successivamente diversi studi hanno aperto la porta al ruolo di prevenzione che possono rivestire gli anticorpi neutralizzanti ed al loro possibile futuro impiego per lo sviluppo di un vaccino; ricordiamo come il trasferimento di immunità passiva mediante inoculo di anticorpi anti BDV in *Lewis rats* immunocompromessi (dove la diffusione del virus riguarda oltre che il SNC anche tessuti extra-nervosi) abbia impedito la diffusione del virus in tessuti al di fuori del SNC (Stitz L. *et al* 1998). In un altro studio è stato provato come il trasferimento passivo di cellule T CD4+ specifiche per BDV (*cells culture-attenuated* BDV) ad alti dosaggi abbia impedito lo sviluppo della sintomatologia e delle lesioni istopatologiche, inducendo una rapida comparsa dell'immunità umorale, cosa che invece non avviene se la somministrazione avviene a bassi dosaggi dove si sviluppa la severa encefalomielite e i segni clinici conseguenti (Furrer E. *et al* 2001; Oldach D. *et al* 1995; Richt J. & Rott R. 2001).

Parapoxivirus Orf virus è considerato un promettente candidato come vettore per la costituzione di nuovi vaccini. Il virus ricombinante da esso derivato (D1701-VrVp40) che esprime la nucleoproteina p40 di BDV, rappresenta un importante antigene per l'induzione della risposta immunitaria verso BDV. *Lewis Rats* di 4-5 settimane sono stati immunizzati mediante inoculazione intramuscolare di D1701-VrVp40 con tre dosi a distanza di due

settimane, e sono poi stati infettati per via intracerebrale con BDV. Si è visto che tale immunizzazione è in grado di sviluppare un'elevata risposta anticorpale specifica capace di impedire la diffusione e l'eliminazione del virus dopo inoculazione intracerebrale, la manifestazione della forma clinica, e riducendo lo sviluppo delle lesioni istopatologiche. Inoltre, si è potuto verificare che, dopo 4 e 8 mesi i soggetti trattati presentavano ancora immunizzazione verso BDV. Questi risultati aprono la strada verso lo sviluppo di un vaccino ideale in grado di indurre un'efficacia e durata immunizzazione con riduzione dell'eliminazione virale e delle lesioni cerebrali (Henkel M. *et al* 2005).

Attualmente per il trattamento di BDV viene utilizzata *Amantadine sulphate*, un farmaco utilizzato per il trattamento dell'influenza A, per il morbo di Parkinson, la sclerosi multipla, in caso di lesioni post traumatiche del SNC e nelle forma di demenza. Agisce influenzando il sistema dopaminergico, serotonergico e noradrenergico e i recettori NMDA. L'uso di tale sostanza sia in umani che in animali ha condotto ad un miglioramento della sintomatologia clinica correlata alla depressione. La terapia con la molecola in oggetto risulta molto efficace in corso di semplice infezione da BDV in atto o di malattia manifesta, ed in Germania viene largamente usato. La terapia non elimina il virus dall'organismo ma riesce a ridurre l'attività replicativa, agendo quindi come virus-statico, garantendo nella maggior parte dei casi la remissione della sintomatologia. Qualora si intraprenda la terapia troppo precocemente, ovvero prima della replicazione virale, l'effetto non si nota se non dopo un lungo periodo di tempo. Per questo motivo è bene iniziare la terapia dopo uno o due mesi dalla comparsa degli antigeni nel sangue. Indipendentemente dalla comparsa dei sintomi in genere si può iniziare la terapia quando nel sangue compaiono gli immunocomplessi. Il farmaco, utilizzato per BDV negli equidi, prevede la somministrazione per via orale secondo il seguente schema:

- 1° giorno: 500 mg *Amantadine sulphate* (750 mg se la viremia è molto alta)
- 2° giorno: 500 mg *Amantadine sulphate* (1000 mg se la viremia è molto alta)
- 3° giorno: 750 mg *Amantadine sulphate* (1000 mg se la viremia è molto alta)
- 4-7° giorno: 1000 mg *Amantadine sulphate* (1500 mg se la viremia è molto alta)
- 8-30° giorno: 1500 mg *Amantadine sulphate* (2000 mg se la viremia è molto alta)
- 31-90° giorno: 1500 mg *Amantadine sulphate* (2000 mg se la viremia è molto alta); in caso la sintomatologia scompaia e il cavallo recuperi una buona forma fisica, il dosaggio dal giorno 31 al 90° può essere ridotto a 1000 mg.

La durata complessiva della terapia non è mai inferiore alle 12 settimane, ma se il livello di viremia è alto la durata si aggira attorno ai 6 mesi e a volte si protrae anche oltre. La durata non può quindi essere decisa a priori, ma si valuta in relazione alla viremia valutata con prelievi ematici mensili. L'80% dei cavalli risponde positivamente alla terapia, che non presenta effetti collaterali noti. Bisogna però sottolineare che essa si deve svolgere in condizioni di assoluto riposo del soggetto trattato: lo stress è un importante fattore nella replicazione virale e può ridurre gli effetti del farmaco. Quando il cavallo manifesta apatia o si mostra spaventato e difficile da avvicinare è bene combinare la terapia con un trattamento sintomatico antidepressivo (Nortriptylin 50-100 mg) e con uno stabilizzante dell'umore (Carbamazepina 100-400 mg) per un periodo che può andare dalle 8 settimane ai 6 mesi (Bode L. *et al* 1997; Codazza D. & Nativi D. 2005).

Anche altre sostanze sono state studiate per il trattamento di BDV; studi in vitro hanno dimostrato l'effetto inibitore sulla replicazione virale della Ribavirina, ma ancora non ne è stata dimostrata l'efficacia in vivo. Altra molecola studiata è 1- β -D*Arabinofuranosylcytosine* (Ara-C), un noto inibitore della DNA polimerasi comunemente usato nel trattamento delle leucemie; studi sperimentali sia in vitro che in vivo hanno dimostrato la sua capacità inibitoria a livello di replicazione di BDV, prevenendo l'infezione persistente del SNC e lo sviluppo della sintomatologia clinica. Questi risultati aprono la strada al futuro sviluppo di terapie antivirali verso BDV (Bajramovic J. *et al* 2002).

1.8 INFEZIONE NELL'UOMO

Nell'uomo i disturbi psichiatrici possono derivare da un ampio gruppo di malattie diverse con eziologia eterogenea (predisposizione genetica, esposizione allo stress, fattori ambientali). È stato suggerito che alcune infezioni zoonotiche possano influenzare il decorso di alcuni disturbi psichiatrici, in particolare *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi* e il virus della malattia di Borna (BDV). Come già detto Borna virus colpisce il sistema nervoso centrale (CNS), e la distribuzione intracerebrale delle lesioni nell'uomo ricalca quella osservata negli animali con prevalente interessamento del sistema limbico (sede dell'elaborazione della sfera emozionale e della memoria), ed è associato allo sviluppo di anomalie comportamentali, dell'umore e cambiamenti cognitivi. Durante l'infezione, BDV altera il SNC con diversi meccanismi: attraverso il legame di proteine virali

con i recettori dei neurotrasmettitori, in particolare quelli dopominirgici (collegati a disturbi neuropsichiatrici quali schizofrenia, dipendenze e disturbi extrapiramidali), e indirettamente attraverso la risposta immunitaria e le reazioni infiammatorie che si sviluppano. Entrambe le risposte comportano alterazioni dello stato d'animo, del comportamento e cambiamenti emotivi negli individui infetti, e possono essere associate a disturbi psichiatrici nell' uomo (disturbi affettivi, dipendenze e disturbi psicotici).

Un aumento del tasso di infezione per BDV è stato valutato in pazienti psichiatrici (con diagnosi di depressione, disturbo affettivo bipolare e schizofrenia) e in pazienti immunocompromessi, soprattutto quelli con immunosoppressione cellulare (tra cui pazienti HIV positivi) (Rackova S. *et al* 2010).

Anticorpi specifici per BDV furono trovati per la prima volta in sieri umani nel 1976 in un paziente affetto da epilessia e disturbi psichiatrici. Nel corso degli anni che seguirono sono stati testati sieri e liquor di migliaia di pazienti psichiatrici in Germania, Svizzera, Europa, Giappone, USA, Australia, Africa, Brasile, Taiwan, Thailandia, Polonia, Svezia e Repubblica Ceca. Nel 1995 si riuscì ad ottenere il primo isolamento di RNA virale da leucociti circolanti e polimorfonucleati in pazienti psichiatrici. Sono risultati sieropositivi pazienti affetti da schizofrenia, sindrome da affaticamento cronico, sindrome maniaco depressiva, depressione ricorrente, attacchi di panico, distrofia muscolare e morbo di *Parkinson*. I pazienti psichiatrici nei quali più frequentemente si rileva sieropositività per BDV sono quelli affetti da *major depressive disorder*, che nelle forma acuta è caratterizzata da indifferenza per qualsiasi cosa, incapacità di provare piacere per i normali eventi della vita, umore depresso, ritardo psicomotorio, pensieri suicidi, numero eccessivo di ore di sonno, impossibilità di concentrarsi e deficit mnemonici. Questa molteplicità di possibili manifestazioni potrebbe essere il risultato di molti fattori: le aree cerebrali interessate, l'entità della risposta infiammatoria, l'immunocompetenza del soggetto infettato, la sua eventuale predisposizione genetica e la presenza di cause di stress. Inoltre viene sempre più accettata l'ipotesi che BDV determini delle alterazioni funzionali transitorie a livello di neurotrasmettitori più che alterazioni strutturali, organiche, la quale spiegherebbe la ricorrenza dei sintomi, specialmente nei disordini dell'umore come il *major depressive disorder*, che spontaneamente va incontro a periodi di remissione e riacutizzazione (Codazza D. & Nativi D. 2005).

La positività per Borna virus in pazienti psichiatrici varia molto nei diversi lavori svolti. Queste differenze possono essere causate dall'uso di metodiche di laboratorio e materiali

biologici differenti, dalla diagnosi psichiatrica, dalla gravità della psicopatologia dei pazienti e dalle regioni geografiche indagate (Allegato 1).

Le prime individuazioni di anticorpi, eseguite da Rott e colleghi nei pazienti psichiatrici nel 1985, utilizzavano il metodo dell' IFA (immunofluorescenza), con positività per Ab dell' 1-4% dei pazienti psichiatrici e nel 20% dei pazienti con depressione acuta. Negli anni successivi con lo sviluppo dell' ELISA per la ricerca di Ag, CIC e Ab (ELISA triplice), è emersa una maggior positività nei pazienti psichiatrici (tra 50% e il 90%), rispetto agli individui sani (fra il 20% e 30%). La forza e la durata dei CIC può essere correlata con la gravità dei sintomi (maggiore quantità di BDV CIC e Ag sono stati rilevati in pazienti con psicopatologia grave rispetto ai livelli più bassi nei pazienti con sintomi lievi). Diversi altri lavori non hanno però rilevato positività per BDV nei pazienti psichiatrici o con patologie sopra citate, e non confermano quindi la correlazione tra BDV e tali patologie (Rackova S. *et al* 2010). Come già osservato, la mancata standardizzazione delle metodiche sierologiche ha aperto e mai chiuso la *querelle* circa il valore da attribuire ai risultati ottenuti dai diversi laboratori (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Analogamente a quanto evidenziato in felini affetti da FIV rispetto a soggetti sani, la prevalenza di infezione nei pazienti HIV positivi è nettamente superiore ai pazienti di controllo. Una spiegazione possibile potrebbe essere riconducibile alle anomalie o deficit funzionali che coinvolgono i linfociti T in corso di infezione da HIV, laddove è noto che la risposta infiammatoria in corso di BDV è appunto mediata prevalentemente dai linfociti T (Cotto E. *et al* 2003). In relazione a queste considerazioni sono stati eseguiti alcuni studi circa l'aumento o meno della sieropositività per BDV in relazione a situazioni di compromissione immunitaria legata allo stress, come accade nel periodo di disintossicazione di soggetti con dipendenza da alcol o da droga. Sono stati esaminati pazienti dipendenti per la presenza di BDV CIC nel siero mediante ELISA all'inizio di disintossicazione, e dopo otto settimane di astinenza, e su di un gruppo di donatori di sangue come soggetti di controllo. E' stata rilevata una positività nel 36,59% dei pazienti tossicodipendenti al giorno 0 e nel 42,86% al giorno 56. Il gruppo di controllo era positivo nel 37,3%. Tuttavia, da un punto di vista statistico pazienti dipendenti non avevano livelli significativamente più alti di BDV CIC rispetto al gruppo di controllo. I livelli più elevati di BDV CIC sono stati rilevati in pazienti con più bassi livelli di GGT (gamma-glutamyl transferasi) e ad un'età inferiore. Inoltre non è stata trovata alcuna associazione tra positività BDV CIC e altre caratteristiche anamnestiche e demografiche (Rackova S. *et al* 2010).

In relazione all'età dei soggetti si è potuto notare come la sieropositività sia maggiore nei bambini rispetto agli adulti. Uno studio di sieroprevalenza effettuato in Italia (Sicilia) ha mostrato una sieropositività circa doppia tra i bambini rispetto agli adulti sia dell' Italia che di altri paesi. Nel medesimo studio sono stati testati anche 17 gatti domestici e 7 cavalli oltre a 258 bambini (tra 0-14 anni); per lo studio è stata utilizzata un ELISA triplice. 30/258 (50,4%) dei bambini sono risultati positivi per BDV CIC; nessuna differenza è risultata significativa per il sesso. Quando i campioni positivi sono stati valutati in relazione all'età, è emerso che i bambini con età compresa tra 1-4 anni mostravano una maggior prevalenza, in particolare in riferimento al primo anno di vita, mentre negli anni successivi la prevalenza è diminuita. In Sicilia, come in Italia, BDV infetta i bambini maggiormente nei primi anni di vita, ma sono emerse delle differenze con le altre regioni italiane. In Sicilia la prevalenza dell'infezione è risultata inferiore rispetto al livello nazionale. In particolare, sotto un anno di età nessun bambino è stato trovato positivo (mentre più di un sondaggio condotto in diverse regioni in Italia hanno mostrato che più del 70% dei bambini sotto l'anno di età risultava positivo). Il 12% dei gatti sono risultati positivi; si tratta di una scoperta molto interessante, perché è noto che gli animali domestici sono spesso in stretto contatto con i bambini, ma la prevalenza di infezione dei gatti siciliani non spiega comunque il tasso di infezione trovato nei bambini. Tutti i cavalli, ad eccezione di un animale borderline, sono invece risultati negativi (Patti M. *et al* 2008).

Alcuni autori ritengono che sia ancora da chiarire una questione fondamentale: se la sieropositività umana è data dal medesimo BDV che infetta gli animali o piuttosto da un virus non ancora identificato che ha in comune con esso delle sequenze geniche e che, per così dire, inganna le tecniche diagnostiche in uso. In ogni caso non si può negare l'evidenza dell'esistenza di un virus uguale o molto simile al BDV animale, che infetta l'uomo, né la prevalenza anticorpale significativamente più alta riscontrata nei pazienti psichiatrici rispetto ai sani. Ciò detto è bene rimarcare come la schizofrenia ed altri disordini psichiatrici ad oggi non siano stati posti in relazione certa con nessuna infezione virale e comunque esistono diverse ragioni per cui la relazione infezione virale-sviluppo di disordini psichiatrici sia difficile da provare:

- L'agente eziologico potrebbe infettare il soggetto durante la vita intrauterina o nell'immediato periodo postnatale e poi scomparire.

- Un'agente patogeno assai comune potrebbe indurre malattia attraverso lo sviluppo di una reazione non comune, come ad esempio il virus del morbillo che è in grado di causare panencefalite subacuta sclerosante. In questo caso la difficoltà starebbe nel fatto che la maggioranza della popolazione risulterebbe sieropositiva.
- Un agente eziologico sconosciuto o raro potrebbe essere il responsabile e potrebbe non essere identificato in quanto non ancora disponibili tecniche diagnostiche sensibili per esso.
- Potrebbe essere necessario l'intervento di due distinti agenti eziologici per determinare la malattia.
- E' possibile che l'agente eziologico in questione determini l'insorgenza della malattia solo in determinate condizioni, come l'età del soggetto all'infezione, la localizzazione del patogeno in una determinata area encefalica o la predisposizione genetica del soggetto colpito.
- L'agente eziologico può essere implicato solo in una piccola parte dei casi di disordini psichiatrici, se si considera l'assunto che esse vengono considerate come patologie multifattoriali.
- L'agente eziologico potrebbe essere incorporato nel genoma dell'ospite.
- Infine, è noto come l'identificazione di un agente eziologico (antigene o genoma) a partire dall'encefalo sia estremamente difficile, anche in caso di agenti eziologici conosciuti e in presenza di quadri patologici noti, nei casi in cui la concentrazione del patogeno sia bassa o esso abbia una distribuzione non omogenea nell'encefalo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

A lungo si è dibattuto circa l'eventuale potenziale zoonotico del BDV, le pubblicazioni più recenti tendono ad escludere che il virus possa passare all'uomo ma postulano piuttosto che l'uomo sia, al pari di altri ospiti, egli stesso un ospite e che la trasmissione del BDV nella specie umana segua le stesse modalità intraspecifiche descritte nella specie equina. Si segnala tuttavia il risultato di un lavoro giapponese che illustra una sieroprevalenza significativamente più alta per BDV (2,6-14,8%) in donatori di sangue provenienti dalla

regione di Hokkaido, dove viene allevato il 90% dei trottatori, rispetto a donatori di sangue provenienti da una città (1%) (Takahashi H. *et al* 1997).

In sintesi non è ancora possibile dimostrare la reale correlazione tra BDV e patologie psichiatriche dell'uomo, né è ancora chiaro se esista o meno la possibilità per Borna di essere considerato un agente causa di zoonosi. Sarebbe importate svolgere contemporaneamente degli studi di sieroprevalenza con un maggior numero di persone, bambini e loro animali domestici.

1.9 DIAGNOSI

1.9.1 INTRA VITAM

La diagnosi *intra vitam* per BD può trovare conferma solo se:

- esistono rilievi clinici di segni neurologici
- sono dimostrati anticorpi specifici nel siero e/o nel LCS (liquido cerebro spinale)
- ci sono alterazioni citologiche e biochimiche del LCS

Il sospetto viene avanzato qualora ci si trovi di fronte ad un animale con sintomatologia neurologica, soprattutto se in area riconosciuta endemica. La conferma non può prescindere dall'utilizzo di esami collaterali, quali l'esame microscopico del LCS e la sierologia che ricerca sia nel LCS che nel siero anticorpi monoclonali o policlonali verso il BDV. Le tecniche sierologiche attualmente in uso sono *western blotting* (WB), ELISA, IFA e RT-PCR.

I parametri ematologici e biochimici sono di scarso aiuto poiché solitamente rientrano nei limiti fisiologici; l'iperbilirubinemia è sempre presente ma ancora non se ne conoscono le cause. L'esame del LCS, nella fase acuta della malattia, rileva un lieve aumento della quantità proteica, reazione di Pandy sempre positiva e pleocitosi linfo-monocitica; nei casi cronici i parametri citati non presentano variazioni di sorta se non un elevato aumento del lattato (Richt J. & Rott R. 2001).

Per quanto riguarda la sierologia, è bene ricordare che in corso di infezione naturale gli anticorpi sono generalmente a basso titolo e non sono presenti per tutta la durata della vita dell'animale. In corso di infezione sono riscontrabili periodi in cui gli anticorpi non risultano *detectable* mentre in altri periodi il loro livello sale, questo in relazione con

l'espressione del genoma virale. Nei casi acuti la ricerca anticorpale porta sempre a risultati positivi, mentre nei casi iperacuti non sempre si riescono ad isolare (Fig.13). L'impiego della sierologia, (IFA, ELISA, WB), è stata, ed è tutt'ora, al centro di controversie circa l'attendibilità dei vari test proposti, poiché i risultati ottenuti dai vari gruppi di ricerca molto spesso non sono ripetibili. La mancanza di standardizzazione risulta essere il principale tra gli ostacoli per la creazione di una banca dati omogenea ed attendibile, sia per i sieri animali che umani. E' stato pubblicato uno studio in cui è stato fatto un resoconto di *screening* effettuato su 158 sieri equini pervenuti in laboratorio per controlli di *routin*. I campioni sono stati inizialmente sottoposti a metodi di WB, i positivi sono poi stati testati con IFA ed ELISA per la conferma diagnostica. Le tre analisi sono state eseguite in tre diversi laboratori, in nazioni diverse, ed hanno condotto a risultati assai contrastanti che pongono un serio interrogativo circa l'affidabilità delle metodiche utilizzate (Codazza D. & Nativi D. 2005).

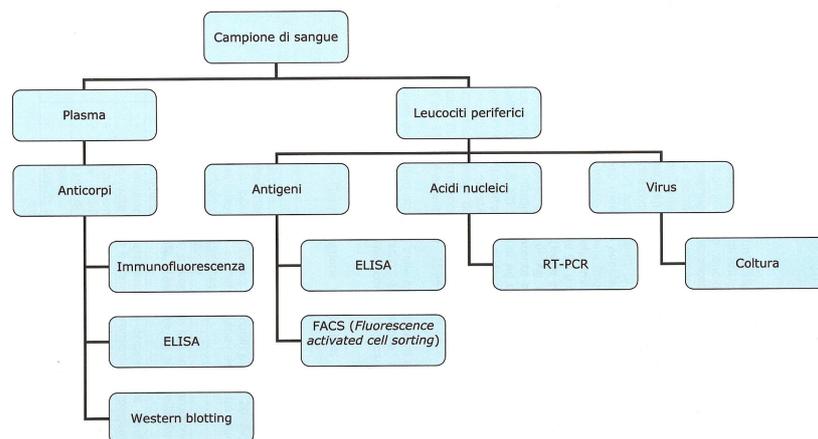


Fig.13 possibilità diagnostiche per la sierologia (Codazza D. & Nativi D. 2005 modificata).

1.9.2 POST MORTEM

La diagnosi *post mortem* può essere effettuata mediante esame istologico, La maggior concentrazione virale si osserva nel sistema limbico, ma comunque il virus si può trovare anche in altre sedi del SNC. Il rischio di falsi negativi è intrinseco all'esame istologico, considerando la bassa percentuale di neuroni infettati interessati sul totale. L'esame istologico inoltre non sempre presenta le lesioni caratteristiche già descritte; ricordiamo

però che il rinvenimento di corpi di *Joest-Degen*, seppur raro, sia da considerarsi patognomico (Richt J. & Rott R. 2001).

La PCR vanta un altissima sensibilità ma pecca di specificità, in quanto può dare dei falsi positivi dovuti ad errori procedurali o accidentali da contaminazione in laboratorio; questo aspetto è talmente presente da aver messo in discussione i risultati di numerosi studi, ottenuti con PCR, da alcuni autori. L'isolamento virale è possibile ma laborioso, e richiede numerosi passaggi su linee cellulari precise.

La diagnosi di BD è dunque difficile, e difficile è interpretare i risultati delle analisi in assenza di standardizzazione delle metodiche: ogni laboratorio ha una sua procedura, sia nella sierologia che nella ricerca dell'agente stesso. Di fatto gli ultimi anni sono stati segnati da accese discussioni tra i vari gruppi di lavoro, il che non fa altro che rimarcare la necessità di una standardizzazione delle metodiche accettate a livello internazionale (Taieb O. *et al* 2001).

CAPITOLO II: OBIETTIVI DEL LAVORO

L'obiettivo generale dell'indagine è teso alla verifica dell'eventuale presenza di infezione da Virus della Malattia di Borna in equidi residenti in aree del territorio Nazionale sino ad oggi ritenute indenni ma a rischio di introduzione dell'infezione per contiguità geografica con l'Austria, Paese nel quale negli ultimi anni è stata confermata la presenza del virus nei cavalli.

Per raggiungere tale obiettivo è stato condotto uno studio pilota finalizzato a rilevare la presenza di sieropositività nei confronti della infezione da Virus della Malattia di Borna negli equidi delle province di Trento e Bolzano. Trattandosi di uno studio condotto mediante diagnosi indiretta, i risultati ottenuti hanno carattere presuntivo rispetto alla reale e pregressa circolazione virale in queste Province. Tuttavia, la dimostrazione della presenza di sieropositività, sporadiche o diffuse, potrà fornire utili elementi di valutazione circa l'opportunità di condurre studi più approfonditi che abbiano come scopo la stima della sieroprevalenza per virus Borna e l'eventuale adozione di misure di monitoraggio e sorveglianza basate su idonei criteri di rappresentatività per le popolazioni di equidi residenti nelle due Province. In conclusione, l'obiettivo specifico del presente studio pilota è stato raggiunto attraverso la selezione di un campione di equidi, sottoposti a controllo sierologico nel 2009/2010 nell'ambito delle attività previste dal Piano di sorveglianza nazionale per l'Anemia Infettiva degli equidi, che è stato analizzato anche per la presenza di anticorpi nei confronti del virus della Malattia di Borna.

CAPITOLO III: MATERIALI E METODI

3.1 CAMPIONAMENTO

La modalità di selezione dei soggetti da campionare si è avvalsa della consulenza del Centro Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana (nelle persone dei Dott. Gian Luca Autorino e Dott. Marcello Sala). Dai dati desunti dal Database 2007 dell'Anemia Infettiva detenuto dal CRAIE di Pisa, unica fonte dati verosimilmente completa e rappresentativa della reale numerosità della popolazione di equidi presente (non essendo ancora disponibili i dati centralizzati dell'anagrafe equina nazionale), è possibile stimare la seguente popolazione di riferimento per le Province di Trento e Bolzano:

Tabella 1

<i>Provincia</i>	<i>N°equidi testati per AIE 2007</i>	<i>N°di insediamenti</i>
TN	670	257
BZ	1.156	192
Totale	1.826	449

Per raggiungere più facilmente gli scopi dello studio, è stato particolarmente importante concentrare i controlli sierologici tra gli equidi maggiormente a rischio di esposizione per una eventuale infezione da virus Borna, ossia i capi detenuti in condizioni “**rurali**”, soggetti con **possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto** e cavalli **stanziali**. In effetti, al fine di poter ascrivere le eventuali sieropositività riscontrate ad infezioni effettivamente avvenute in loco e quindi poter ipotizzare induttivamente una effettiva circolazione virale, è stato fondamentale procedere al controllo sierologico di **equidi residenti stabilmente** da più anni e non soggetti a movimentazione (per allenamento, competizioni ecc.). Non potendo ricostruire la storia residenziale degli equidi presenti nelle due Province sulla base del Database AIE, è stato necessario delegare la scelta dei soggetti da campionare agli operatori (veterinari delle ASL e personale dell'IZS delle due regioni) che hanno effettiva conoscenza del territorio, sulla base di una valutazione sicuramente arbitraria ma certamente più circostanziata e adeguata alle finalità dello

studio. La scelta di operare il controllo, prioritariamente, su equidi detenuti in condizioni rurali e/o all'aperto è basata sulle evidenze prodotte da alcuni studi condotti in Europa i quali descrivono il possibile ruolo quale serbatoio del virus di un insettivoro , **Crocidura ventrebianco** (*Crocidura leucodon*), mammifero soricomorfo della famiglia dei Soricidi, diffuso in Europa e presente anche in Italia (Hilbe M. *et al* 2006).

Sulla base dei denominatori riportati in Tabella 1, per ogni Provincia è stato calcolato un campione necessario a rilevare, con una probabilità del 95%, almeno un equide positivo nel caso la prevalenza reale di soggetti positivi sia pari o superiore al 2% (Ipotesi nulla). Nel caso nessun soggetto risulti positivo si potrà concludere, accettando l'ipotesi alternativa, che la prevalenza dell'infezione è inferiore al 2%. In ogni caso, la numerosità campionaria calcolata (Tabella 2.) potrà consentire di operare una stima, seppure grezza, della prevalenza, utile a fini conoscitivi.

Sulla base di tali assunti è stato quindi calcolato il seguente campione di equidi da sottoporre ad esame sierologico per BORNA, su base provinciale:

Tabella 2: campioni di equidi da testare (LC 95% - soglia di prevalenza > 2%)

Provincia	Denominatore (Pop. Target)	Numerosità campionaria (equidi da testare)	Frazione campionaria %
TN	670	137	21
BZ	1.156	140	12
Totale	1.826	277	

3.1.1 CRITERI DI SELEZIONE DEGLI EQUIDI TESTATI

Come specificato in precedenza, ai fini del raggiungimento della numerosità campionaria richiesta, sono stati selezionati equidi:

- detenuti in condizioni “**rurali**”
- con **possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto**
- **residenti stabilmente**

La selezione dei campioni aventi tali caratteristiche è stata operata sia sui sieri già stoccati per AIE, sia su sieri di nuovo conferimento nell'ambito del Piano AIE 2009/2010, avendo l'accortezza di distribuirli in maniera uniforme rispetto alle aziende (strutture) presenti sui rispettivi territori di competenza nonché all'area di provenienza (comune). **E' stato selezionato un numero massimo di 4 sieri (equidi) per azienda.**

Nota: in questa fase, la randomizzazione dei soggetti da campionare non viene ritenuta fondamentale, in quanto lo scopo è limitato alla verifica della presenza dell'infezione, privilegiando le categorie di equidi potenzialmente più a rischio (categorie per le quali la possibilità teorica di reclutare soggetti positivi è maggiore). Si tratta quindi di operare nell'ambito del "migliore scenario" possibile al fine del reclutamento dei "casi". Tale scenario, quindi, rappresenta un approccio conservativo in grado di offrire le maggiori probabilità di individuare la presenza dell'infezione e, in caso di completa negatività del campione, di poter escludere la sua presenza con un elevato livello di confidenza. Un approccio più sistematico potrà essere invece utilizzato in un eventuale studio successivo finalizzato alla stima della sieroprevalenza territoriale, attraverso l'adozione di un appropriato disegno dello studio in grado di garantire piena rappresentatività del campione.

Schede di prelievo dei campioni.

Per ogni campione o serie di campioni (massimo 4 per azienda) provenienti da una singola azienda è stata compilata una scheda accessoria (vedi allegato 3)

Dei 137 sieri raccolti nella provincia di Trento il 70% è rappresentato da soggetti di sesso femminile e il 30% da soggetti di sesso maschile (comprendenti sia maschi interi che castroni). Il 38.6% ha età compresa tra i 16-25 anni, il 31.4% tra i 6-15 anni e il 30% tra 1-5 anni. Le razze maggiormente rappresentate sono Avelignese (29.6%), Quarter Horse (25.5%), Paint Horse e incroci (9.5% rispettivamente). I soggetti vivono principalmente in area considerata campagna (73%), mentre una minor parte (27%) vive in aree considerate urbane. Inoltre il 57.7% vive in zone di mezza montagna (tra i 500-1000 metri di altitudine sul livello del mare), il 18.2% in zona di collina (300-500mt), il 12.4% in zona di montagna (>1000mt) e 11.7% in pianura (<300mt). (Sono state considerate zone di campagna le aree con una superficie di terreno aperto al di fuori o comunque lontano dai centri urbani o con qualche centro abitato, perlopiù costituito da piccole comunità o da terre estese libere che vengono coltivate o lasciate incolte, mentre la zona urbana per definizione è rappresentata dall'insieme di edificazioni che formano una città) (vedi Allegato 2 sezione TN).

Dei 140 sieri raccolti nella provincia di Bolzano il 67.2% è rappresentato da soggetti di sesso femminile, il 32.8% da soggetti di sesso maschile (comprendenti sia maschi interi che castroni). Il 48.6% ha età compresa tra i 6-15 anni, il 40% tra i 1-5 anni, il 10.8% tra

16-25 anni e lo 0.8% con età superiore ai 26 anni. La razza maggiormente rappresentata è quella degli Avelignesi (69.3%). I soggetti vivono principalmente in area considerata campagna (86.4%); bisogna considerare che in questa regione è ancora molto presente l'allevamento allo stato semi-libero dei soggetti Avelignesi e la pratica dell'alpeggio estivo. Solo il 13.6% vive in aree considerate urbane. Inoltre il 46.4% vive in zone di mezza montagna, il 45% in zona montagna, il 5.7% in zona di collina e il 2.8% in pianura (vedi Allegato 2 sezione BZ).

Sono stati selezionati solo i soggetti considerati residenti stabilmente (ovvero con movimenti limitati all'interno della regione indagata), con possibilità di accesso al pascolo o a recinti all'aperto e considerati rurali (anche i cavalli che vivono in aree urbane si trovano alla periferia dei centri abitati e sono in contiguità con zone di campagna, pascolo o bosco).

I sieri testati sono stati selezionati anche in relazione alla stagione di prelievo (ovvero sono stati selezionati quelli del periodo compreso tra l'inizio della primavera e l'inizio dell'estate), in quanto è noto che la patologia emerge a livello clinico soprattutto, ma non esclusivamente in tale periodo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

3.2 SIEROLOGIA

Per il presente studio abbiamo utilizzato la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IFA), per la ricerca degli anticorpi nel siero di equidi, eseguita presso i laboratori di Virologia Speciale (struttura Complessa 6) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro). Tale metodica, in uso presso il Centro di Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana, è stata scelta come metodica di elezione in quanto ritenuta *gold standart* per la ricerca degli anticorpi nei confronti del BDV.

Non è stato effettuato un test di *screening* in ELISA poiché il numero di campioni analizzati non ha reso necessario l'uso di tale metodo. Inoltre, poiché tale metodo ELISA non è commerciale, ma *in house*, la variabilità delle performance è elevata. Si è quindi ritenuto controproducente ai fini dell'indagine lo sviluppo e la validazione di tale metodo.

3.2.1 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA (IFA)

L'allestimento dei vetrini positivi per virus BD è stato effettuato presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana. Ogni vetrino è costituito da 10 pozzetti con monostrato di cellule infettate con BDV (Mosquito larvae, *Aedes albopictus*, clone C6/36, ATCC-CRL 1660). Il monostrato cellulare è stato fissato al vetrino con Acetone 96%. I vetrini così allestiti sono stati conservati congelati (-20 °C) fino all'esecuzione della prova (Fig.14).

Anticorpo monoclonale specifico nei confronti del virus BD è stato fornito dal Centro di Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana

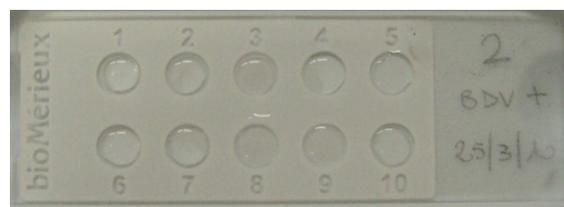


Fig.14 Vetrino utilizzato per l'IFA

Per gli approfondimenti relativi alla tecnica dell'immunofluorescenza vedi Allegato 4

Il protocollo è stato il seguente:

- ✓ Diluire il siero di cavallo 1:30 in soluzione salina fosfato (PBS, pH 7.4)
- ✓ Diluire il controllo positivo (Ab monoclonale di topo) 1:8 in soluzione salina fosfato (PBS, pH 7.4)
- ✓ Distribuire in ogni pozzetto 15 µl di siero in esame. Per ogni vetrino in esame è stato utilizzato :
 - 1 pozzetto per controllo positivo (monoclonale)
 - 1 pozzetto per controllo negativo (PBS)
 - 8 pozzetti per i sieri di cavallo
- ✓ Incubare in camera umida per 60 minuti a 37°C
- ✓ Lavare i vetrini per 5 minuti con PBS. Ripetere il lavaggio una seconda volta.
- ✓ Asciugare il liquido in eccesso.
- ✓ Preparare i sieri secondari come segue:
 - Preparare una soluzione di Blue di Evans (colorante di contrasto, Biomérieux n. cat. 75491) diluito 1:2.000 in PBS
 - Diluire il secondario antitopo IgG-FITC (Sigma Aldrich, n. cat. F0257) 1:100 nella soluzione di Blue di Evans
 - Diluire il secondario anticavallo IgG-FITC (Sigma Aldrich, n. cat. F7759) 1:200 nella soluzione di Blue di Evans
- ✓ Aggiungere 15 µl di siero secondario specifico in ogni pozzetto
- ✓ Incubazione in camera umida per 60 minuti a 37°C
- ✓ Lavare i vetrini per 5 minuti con PBS, ripetere il lavaggio una seconda volta.
- ✓ Effettuare un lavaggio veloce in acqua distillata sterile
- ✓ Asciugare il liquido in eccesso
- ✓ Aggiungere una goccia di liquido di montaggio contenente il 20% di glicerolo (Millipore, n. cat. 5096).

- ✓ Coprire il preparato con un vetrino copri oggetto e conservarlo al buio fino alla lettura.
- ✓ Lettura con microscopio a fluorescenza: le cellule infettate vengono rilevate sulla base di inclusioni di colore verde brillante localizzate a livello nucleare.

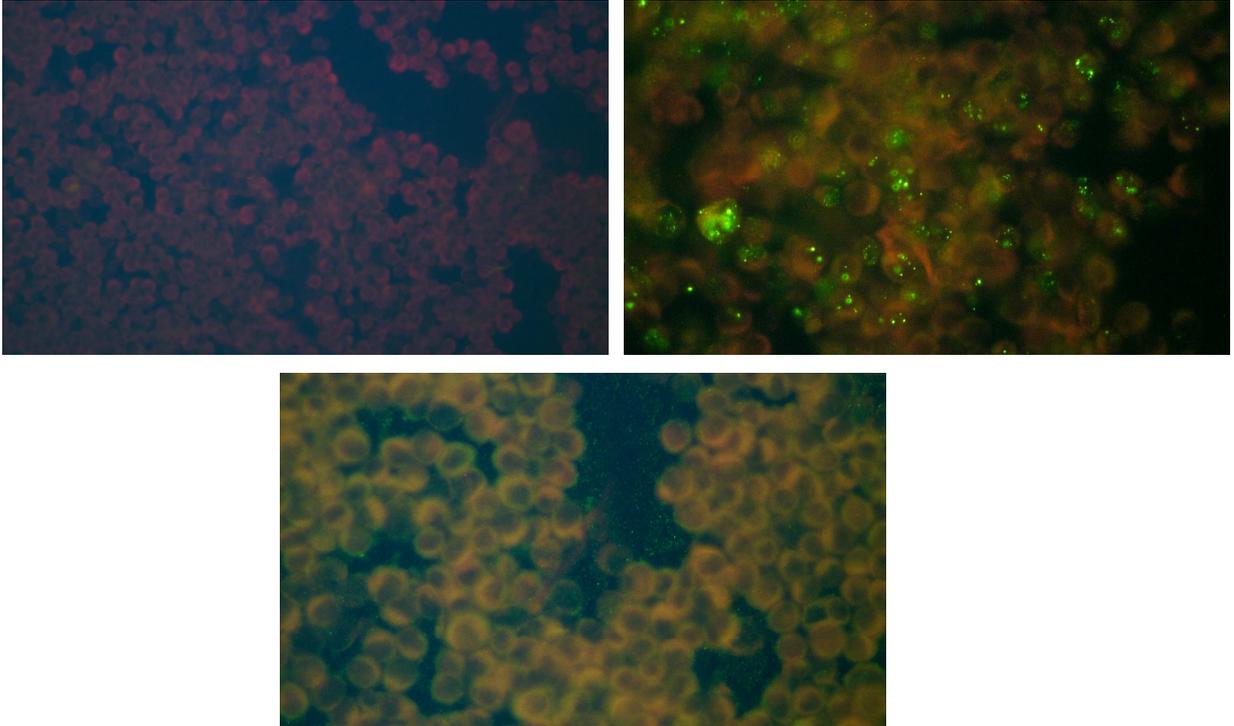


Fig.15 In alto a sinistra si noti il controllo negativo, a destra il controllo positivo, sotto in posizione centrale un siero testato negativo.

CAPITOLO IV: RISULTATI e DISCUSSIONE

Il campione da noi testato è costituito da 277 sieri di cavalli raccolti nell'ambito del Piano AIE 2009/2010. Di questi 137 provengono dalla Provincia Autonoma di Trento e 140 dalla Provincia Autonoma di Bolzano.

I sieri sono stati testati con Immunofluorescenza Indiretta per la ricerca anticorpale per virus della malattia di Borna su protocollo fornito dal Centro Referenza Malattie Virali degli Equidi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni del Lazio e Toscana.

Il lavoro da noi condotto rappresenta una delle più estese ricerche sierologiche attuate per Borna effettuate sul territorio del Trentino Alto Adige. Solo un precedente studio eseguito da Codazza e collaboratori (Codazza D. & Nativi D. 2005) con l'utilizzo di tre metodi di ELISA per la ricerca degli Ab dell' Ag e degli immunocomplessi ha testato una piccola quota di cavalli in tale regione (Fig.16).

Regione	Neg.	Pos.	Dubbi	Totali	Negativi	Positivi	Dubbi
Lazio	21	1	0	22	95,45%	4,55%	0,00%
Lombardia	112	82	2	196	57,14%	41,84%	1,02%
Friuli V.G.	6	13	1	20	30,00%	65,00%	5,00%
Emilia R.	63	30	1	94	67,02%	31,91%	1,06%
Sicilia	9	0	0	9	100,00%	0,00%	0,00%
Umbria	14	1	0	15	93,33%	6,67%	0,00%
Trentino A.A.	15	1	0	16	93,75%	6,25%	0,00%
Piemonte	0	1	0	1	0,00%	100,00%	0,00%
Toscana	1	1	0	2	50,00%	50,00%	0,00%
Sardegna	97	4	0	101	96,04%	3,96%	0,00%
TOTALE	338	134	4	476			

Fig.16 Esiti delle analisi sierologiche condotte da Codazza e collaboratori in diverse regioni d'Italia tra cui il Trentino A.A. Su 16 cavalli testati uno è risultato positivo (Codazza D. & Nativi D. 2005).

Dei sieri testati è risultata **negativa** per la ricerca anticorpale di Borna virus con IFA la totalità del campione.

<i>Provincia</i>	<i>N°equidi testati per Borna</i>	<i>N°positivi</i>
TN	137	0
BZ	140	0
Totale	277	0

Il risultato ottenuto permette di escludere che la prevalenza massima ipotizzabile sia superiore al 1.04%, con un limite di confidenza del 95%.

L'inaspettato risultato negativo ottenuto risulta in disaccordo con i dati finora riportati in letteratura non rispecchiando i valori medi del 20-40% di positività noti per equidi apparentemente sani.

In relazione a tali risultati è opportuno effettuare diverse considerazioni:

La metodica utilizzata in questo lavoro per molti autori è considerata poco sensibile e specifica se confrontata ad altre tecniche diagnostiche quali ELISA e WB. Infatti secondo questi il 30% dei campioni che risulta negativo in realtà è positivo, con quindi una sottostima della sieroprevalenza reale (Bode L. *et al* 2003; Codazza D. & Nativi D. 2005).

E' bene ricordare che l'immunofluorescenza Indiretta da noi usata ricerca gli anticorpi nel siero dei soggetti testati. E' noto che in corso di infezione naturale gli anticorpi sono generalmente a basso titolo e non sono presenti per tutta la durata della vita dell'animale. Periodi in cui la risposta umorale nei confronti del virus BD non è sufficiente per essere riconosciuta con le metodiche sierologiche a nostra disposizione, possono alternarsi a periodi in cui invece tale risposta viene notevolmente stimolata dall'espressione del genoma virale nell'ospite infetto. L'efficienza della replicazione virale nell'ospite è a sua volta subordinato a fattori sia genetici che fisiologici che ambientali (stress, altre patologie, concorsi sportivi etc). Nei soggetti acuti di BD, la ricerca anticorpale porta a risultati positivi nella totalità dei soggetti colpiti, mentre nei casi iperacuti non sempre la risposta immunitaria è efficiente e di conseguenza non sempre la diagnosi sierologica è positiva (Codazza D. & Nativi D. 2005; Durrwald R. & Ludwig H. 1997).

D'altronde il nostro studio prevedeva a monte una selezione di soggetti potenzialmente più a rischio, quindi con caratteristiche tali da aumentare la probabilità di rinvenire dei soggetti positivi. Non si è trattato di eseguire un campionamento randomizzato ma di operare nel miglior scenario possibile per rinvenire qualche soggetto positivo al fine di individuare l'eventuale presenza dell'infezione. In caso di completa negatività del campione, si può escludere la presenza dell'infezione con un elevato livello di confidenza.

Di fatto però non sarebbe corretto assumere come certezza l'assenza di Borna Virus sul territorio del Trentino A.A. per molteplici motivazioni. In primo luogo, i soggetti del campionamento sono stati analizzati per un periodo di tempo limitato (2009-2010). Inoltre, è stato utilizzando un unico test diagnostico sierologico su soggetti non sintomatici. Il test IFA applicato permette di identificare con elevate sensibilità e specificità le immunoglobuline della classe G (IgG) nel siero dei cavalli in esame. Tuttavia, in caso di risposta immunitaria precoce, la presenza delle Ig di classe M (che sono maggiormente rappresentate in questa fase dell'infezione) non viene rivelata mediante il test da noi utilizzato. Affiancare all'effettuato screening sierologico in IFA, un protocollo diagnostico che preveda la ricerca di differenti classi di immunoglobuline (IgM ad esempio) ed eventualmente l'antigene virale potrebbero avvalorare i risultati da noi ottenuti oppure confermare la presenza di infezioni precoci ovvero ipo-reattive.

Sarebbe inoltre interessante concentrare le ricerche per Borna su cavalli con sintomatologia neurologica manifesta, testando i medesimi soggetti che per obbligo di legge devono essere esaminati per la *West Nile disease* e per encefaliti virali (Rif Reg Polizia Vet???)

Potrebbe altresì risultare utile concentrare le ricerche nei cavalli ospitati in strutture igienicamente non impeccabili, ad esempio in fattorie ove alloggiano altre specie di animali, piuttosto che in scuderie specializzate, dato che in letteratura è riportata una maggior positività tra tali soggetti (Codazza D. & Nativi D. 2005).

A tale proposito, risulta evidente che la ricerca di un'infezione virale in una specie *spill-over*, ovvero ospite occasionale del patogeno, in assenza di dati sull'effettiva prevalenza nel suo serbatoio naturale (*che peraltro risulta ancora da chiarire*) può portare ad una sottostima della prevalenza dell'infezione sul territorio.

Monitoraggi eseguiti nello stesso territorio, allo scopo di indagare la sieroprevalenza anche in altre specie animali, quali ad esempio la popolazione felina, e nell'uomo potrebbero permettere un confronto di tali dati con quelli ottenuti nella popolazione equina.

In conclusione bisogna anche ricordare che l'impiego della sierologia (IFA, ELISA, WB), è stata, ed è tutt'ora, al centro di controversie circa l'attendibilità dei vari test proposti, poiché i risultati ottenuti dai vari gruppi di ricerca molto spesso non sono ripetibili. La mancanza di un rete di laboratori a livello internazionale che operi in modo standardizzato ed applicando protocolli sovrapponibili nelle loro *performances*, risulta essere il principale tra gli ostacoli per la creazione di una banca dati omogenea ed attendibile, sia per i sieri animali che umani.

1. **Bajramovic J.J., Munter S., Syan S., Nehrbass U., Brahic M., Gonzalez-Dunia D.** 2003: *Borna Disease Virus Glycoprotein Is Required for Viral Dissemination in Neurons*. Journal of Virology Vol.77, No.22: 12222-12231.
2. **Bajramovic J.J., Syan S., Brahic M., de la Torre J.C., Gonzalez-Dunia D.** 2002: *1-β-D arabinofuranosylcytosine Inhibits Borna Disease Virus Replication and Spread*. Journal of Virology Vol.76, No.12: 6268-6276.
3. **Binz T., Lebelt J., Niemann H., Hagenau K.** 1994: *Sequence analysis of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep*. Virus research Vol.34: 281-289.
4. **Bode L., Dietrich D.E., Stoyloff R., Emrich H.M., Ludwig H.** 1997: *Amantadine and human Borna disease virus in vitro and in vivo in an infected patient with bipolar depression*. Lancet Vol.349: 178-179.
5. **Bode L., Ludwig H.** 2003: *Borna Disease Virus Infection, a Human Mental-Health Risk*. Clinical Microbiology Reviews Vol.16, No.3: 534-545.
6. **Bode L., Riegel S., Lange W., Ludwig H.** 1992: *Human Infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with chronic diseases and healthy individuals*. Journal of Medical Virology Vol.36: 309-315.
7. **Bode L., Riegel S., Ludwig H., Amsterdam J.D., Lange W., Koprowski H.** 1998: *Borna disease virus specific antibodies in patients with HIV infection and with mental disorder*. Lancet 2, 689.
8. **Carbone K.M., Duchala C.S., Griffin J.W., Kincaid A.L., Narayan O.** 1987: *Pathogenesis of Borna Disease in Rats: Evidence that Intra-Axonal Spread Is the Major Route for Virus Dissemination and the Determinant for Disease Incubation*. Journal of Virology Vol.61, No.11: 3431-3440.
9. **Castrucci G.** 2002: *Infezioni da virus degli animali domestici: Filoviridae, Bornaviridae, Astroviridae, Prioni*. Società editrice Esculapio.
10. **Codazza D., Nativi D.** 2005: *La Borna Disease in Italia: primi rilievi epidemiologici nella specie equina circa una malattia emergente*. Tesi di dottorato di ricerca in igiene veterinaria e patologia animale dell'Università degli studi di Milano.
11. **Cotto E., Neau D., Cransac-Neau M., Auriacombe M., Pellegrin J., Ragnaud J.J., Fillet A., Belnard M., Fleury H., Lafon M.** 2003: *Borna Disease Virus RNA in Immunocompromised Patients in Southwestern France*. Journal of Clinical Microbiology Vol.41, No.12: 5577-5581.
12. **Dauphin G., Legay V., Pitel P., Zientara S.** 2002: *Borna disease: current knowledge and virus detection in France*. Veterinary Research .Vol.33: 127-138.
13. **Dietzel J., Kuhrt H., Stahl T., Kacza J., Seeger J., Webber M., Uhlig A., Reichenbach A.** 2007: *Morphometric Analysis of the Retina from Horses Infected with the Borna Disease Virus*. Veterinary Pathology Vol.44: 57-63.

14. **Durrwald R., Kolodziejek J., Muluneh A., Herzog S., Nowotny N.** 2006: *Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations.* *Microbes and Infection* Vol.8: 917-929.
15. **Durrwald R., Ludwig H.** 1997: *Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography.* *Journal of Veterinary Medicine Series B* Vol.44: 147-184.
16. **Furrer E., Bilzer T., Stitz L., Planz O.** 2001: *Neutralizing Antibodies in Persistent Borna Disease Virus Infection: Prophylactic Effect of gp94-Specific Monoclonal Antibodies in Preventing Encephalitis.* *Journal of Virology* Vol.75, No.2: 943-951.
17. **Giammarioli M., La Rocca S., Steinbach F., Casciari C., De Mia G.** 2010: *Genetic and antigenic typing of border disease virus (BDV) isolates from Italy reveals the existence of a novel BDV group.* *Veterinary Microbiology* Vol.4950: 1-6.
18. **Gonzales-Dunia D., Watanabe M., Syan S., Mallory M., Masliah E., de la Torre J.C.** 2000: *Synaptic Pathology in Borna Disease Virus Persistent Infection.* *Journal of Virology* Vol.74, No.8: 3441-3448.
19. **Gosztonyi G., Ludwig H.** 1995: *Borna disease neuropathology and pathogenesis.* *Current Topics in Microbiology and Immunology* Vol.190: 39-73.
20. **Hagiwara K., Asakawa M., Liao L., Jiang W., Yan S., Chai J., Oku Y., Ikuta K., Ito M.** 2001: *Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China.* *Veterinary Microbiology* Vol.80: 383-389.
21. **Hagiwara K., Kamitani W., Takamura S., Taniyama H., Nakaya T., Tanaka H., Kirisawa R., Iwai H., Ikuta K.** 2000: *Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus.* *Veterinary Microbiology.* Vol.22: 207-216.
22. **Hagiwara K., Matoba Y., Asakawa M.** 2009: *Borna Disease Virus in Raccoons (Procyon lotor) in Japan.* *J. Vet. Med. Sci.* Vol.71, No.8: 1009-1015.
23. **Hagiwara K., Okamoto M., Kamitani W., Takamura S., Taniyama H., Tsunoda N., Tanaka H., Iwai H., Ikuta K.** 2002: *Nosological study of Borna disease virus infection in race horses.* *Veterinary Microbiology* Vol.84: 367-374.
24. **Hallensleben W., Shwemmle M., Hausmann J., Stitz L., Volk B., Pagenstecher A., Staheli P.** 1998: *Borna Disease Virus-Induced Neurological Disorder in Mice: Infection of Neonates Results in Immunopathology.* *Journal of Virology* Vol. 72, No. 5: 4379-4386.
25. **Henkel M., Planz O., Fischer T., Stitz L., Rziha H.J.** 2005: *Prevention of Virus Persistence and Protection against Immunopathology after Borna Disease Virus Infection of the Brain by a Novel Orf Virus Recombinant.* *Journal of Virology* Vol.79, No.1: 324-325.

26. **Hilbe M., Herrsche R., Kolodziejek J., Nowotny N., Zlinszky K., Ehrensperger F.** 2006: *Shrews as Reservoir Hosts of Borna Disease Virus*. Emerging Infectious Diseases Vol.12, No 4: 675-677.
27. **Horimoto T., Takahashi H., Sakaguchi M., Horikoschi K., Iritani S., Kazamatsuri H., Ikeda K., Taschiro M.** 1997: *A Reverse-Type Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies to Borna Disease Virus*. Journal of Clinical Microbiology Vol.35, No.7: 1661-1666.
28. **Iwata Y., Takahashi K., Peng X., Fukuda K., Ohno K., Gonda K., Mori N., Niwa S.I., Shigeta S.** 1998: *Detection and sequence analysis of Borna disease virus p24 RNA from peripheral blood mononuclear cells of patients with mood disorders or schizophrenia and of blood donors*. Journal of Virology Vol.72: 10044-10049.
29. **Jacobsen B., Algermissen D., Schaudien D., Venner M., HerzoS., Wentzx E., Hewicker-Trautwein M., Baumgartner W., Herdenx C.** 2010: *Borna Disease in an Adult Alpaca Stallion (Lama pacos)*. J. Comp. Path Vol.143: 203-208.
30. **Kamhieh S., Hodgson J., Bode L., Ludwig H., Ward C., Flower R.L.P.** 2005: *No evidence of endemic Borna disease virus infection in Autralian horses in contrast with endemic infection in other continents*. Arch.Virol. Vol.151, No.4: 709-719.
31. **Katz J. B., Alstad D., Jenny A. L., Carbone K. M., Rubin S. A., Waltrip II R. W.** 1998: *Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies*. J Vet Diagn Invest Vol.10: 338-343.
32. **Kinnunen M., Billich C., Ek-Kommonen C., Henttonen H., Kallio E., Niemimaa J., Palva A., Staeheli P., Vaheri A., Vapalahti O.** 2007: *Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland*. Journal of Clinical Virology Vol.38: 64-69.
33. **Kistler A.L., Gancz A., Clubb S., Skewes-Cox P., Fischer K., Sorber K., Chiu C.Y., Lublin A., Mechani S., Farnoushi Y., Greninger A., Wen C.C, Karlene S.B., Ganem D., DeRisi J.L.** 2008: *Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent*. Journal of Virology Vol.5: 88.
34. **Kohono T., Goto T., Takasaki T., Morita C., Nakaya T., Ikuta K., Kurane I., Sano K., Nakai M.** 1999: *Fine Structura and Morphogenesis of Borna Disease Virus*. Journal of Virology Vol.73, No.1: 760-766.
35. **Kolodziejek J, Durrwald R, Herzog S, Ehrensperger F, Lussy H, Nowotny N.** 2005: *Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin*. Journal of General Virology. Vol.86, No.2: 385-98.
36. **Lewis A.J., Whitton J.L., Hatalski C.G., Weissenbock H., Lipkin W.I.** 1999: *Effect of Immune Priming on Borna Disease*. Journal of Virology Vol.73, No.3: 2541-2546.

37. **Luo M., Green T., Zhang X., Tsao J., Qiu S.** 2007: *Structural comparisons of the nucleoprotein from three negative strand RNA virus familie.* Virology Journal Vol 4, No.72: 1-7.
38. **Mayer D., Fischer H., Schneider U., Heimrich B., Schwemmler M.** 2005: *Borna Disease Virus Replication in Organotypic Hippocampal Slice Cultures from Rats Results in Selective Damage of Dentate Granule Cells.* Journal of Virology Vol.79, No.18:11716–11723.
39. **Nakamura Y., Nakayama T., Hagiwara K., Momiyama N., Kagawa Y., Taniyama H., Ishihara C., Sata T., Kurata T., Ikuta K.** 1998: *High susceptibility of Mongolian gerbil (Meriones unguiculatus) to Borna disease virus.* Vaccine Vol.17: 480-489.
40. **Nakamura Y., Watanabe M., Kamitani W., Taniyama H., Nakaya T., Nishimura Y., Tsujimoto H., Machida S., Ikuta K.** 1999: *High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan.* Veterinary Microbiology Vol.70: 153-169.
41. **Nowotny N., Kolodziejek J., Jehle C.O., Suchy A., Staeheli P., Schwemmler M.** 2000: *Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus.* Journal of Virology Vol.74, No.12: 5655-5658.
42. **Oldach D., Zink M.C; Pyper J.M., Herzog S., Rott R., Narayan O., Clements E.** 1995: *Induction of Protection against Borna Disease by Inoculation with High-Dose-Attenuated Borna Disease Virus.* Virology Vol.206: 426-434.
43. **Patti M., Vulcano A., Candelori E., Ludwig H., Bode L.** 2008: *Borna disease virus infection in the population of Latium (Italy).* Journal Compilation APMIS Vol.116, No.124: 74-76.
44. **Patti M., Vulcano A., Candelori E., Travali S.** 2008: *Serological evidence for Borna Disease Virus infection in children, cats and horses in Sicily (Italy).* Journal Compilation APMS Vol.116, No.124: 77-79.
45. **Pisoni G., Nativi D., Bronzo V., Codazza D.** 2007: *Serological and epidemiological study of Borna disease virus infection in equine population in Italy.* Comunicazioni di Ricerca Veterinaria Vol.31, No 1: 245-248.
46. **Planz O., Bilzer T., Stitz L.** 1995: *Immunopathogenic Role of T-Cell Subsets in Borna Disease Virus-Induced Progressive Encephalitis.* Journal of Virology Vol.69, No.2: 896-903.
47. **Planz O., Rentzsch C., Batra A., Batra A., Winkler T., Buttner M., Rziha H., Stitz L.** 1999: *Pathogenesis of Borna Disease Virus: Granulocyte Fractions of Psychiatric Patients Harbor Infectious Virus in the Absence of Antiviral Antibodies.* Journal of Virology Vol.73, No.8: 6251-6256.

48. **Pletnikov M.V., Rubin S.A., Schwartz G.J., Moran T.H., Sobotka T.J., Carbone K.M.** 1999: *Persistent neonatal Borna disease virus (BVD) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats.* *Physiology and Behaviour.* Vol.66, No.5: 823-831.
49. **Poenisch M., Wille S., Ackermann A., Staeheli P., Schneider U.** 2007: *The X Protein of Borna Disease Virus Serves Essential Functions in the Viral Multiplication Cycle.* *Journal of Virology* Vol.81, No.13: 7297-7299.
50. **Rackova S., Janu L., Kabickova H.** 2010: *Borna disease virus (BDV) circulating immunocomplex positivity in addicted patients in the Czech Republic: a prospective cohort analysis.* *BMC Psychiatry* Vol.10, No.70:1-8.
51. **Richt J.A., Rott R.** 2001: *Borna disease virus: a mystery as an Emerging Zoonotic Pathogen.* *The Veterinary Journal* Vol.161: 24-40.
52. **Rinder M., Ackermann A., Kempf H., Kaspers B., Korbel R., Staeheli P.** 2009: *Broad Tissue and Cell Tropism of Avian Bornavirus in Parrots with Proventricular Dilatation Disease.* *Journal of Virology* Vol.83, No.11: 5401-5401.
53. **Rudolph M., Kraus I., Dickmanns A., Eickmann M., Garten W., Ficner R.** 2003: *Crystal Structure of the Borna Disease Virus Nucleoprotein.* *Elsevier Science* Vol. 11: 1219-1226.
54. **Sauder C., Staeheli P.** 2003: *Rat model of Borna Disease Virus transmission: Epidemiological implications.* *Journal of Virology* Vol.77, No.23: 12886-12890.
55. **Sobbe M., Bilzer T., Gommel S., Noske K., Planz O., Stitz L.** 1997: *Induction of Degenerative Brain Lesions after Adoptive Transfer of Brain Lymphocytes from Borna Disease Virus-Infected Rats: Presence of CD8+ T cells and Perforin mRNA.* *Journal of Virology* Vol.71, No.3: 2400-2407.
56. **Staeheli P., Sauder C., Hausmann J., Felix Ehrensperger F., Schwemmle M.** 2000: *Epidemiology of Borna disease virus.* *Journal of General Virology* Vol.81: 2123-2135.
57. **Stitz L., Noske K., Planz O., Furrer E., Lipkin I., Bilzer T.** 1998: *A Functional Role for Neutralizing Antibodies in Borna Disease: Influence on Virus Tropism outside the Central Nervous System.* *Journal of Virology* Vol.72, No.11: 8884-8892.
58. **Studdert M.J.** 1996: *Virus Infections of Equines.* Elsevier Amsterdam
59. **Takahashi H., Nakaya T., Nakamura Y., Asahi S., Onishi Y., Ikebuchi K., Takahashi T.A., Katoh T., Sekiguchi S., Takazawa M., Tanaka H., Ikuta K.** 1997: *Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms.* *Journal of Medical Virology* Vol.52: 330-335.
60. **Taieb O., Baleyte J.M., Mazet P., Fillet A.M.** 2001: *Borna Disease Virus and Psychiatry.* *Eur.Psychiatry* Vol.16: 3-10.

61. **Vahlenkamp T.W., Enbergs H. K., Muller H.** 2000: *Experimental and natural borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of the peripheral blood.* Veterinary Microbiology Vol.76: 229-244.
62. **Vahlenkamp T.W., Konrath A., Weber M., Muller H.** 2002: *Persistence of Borna Disease Virus in Naturally Infected Sheep.* Journal of Virology Vol.76, No.19: 9735-9743.
63. **Villanueva I., Gray P., Mirhosseini N., Payne S., Hoppes S., Honkavuori K. S., Briese T., Turner D., Tizard I.** 2009: *The diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Borna virus.* Veterinary Microbiology Vol.143: 196-201.
64. **Volmer R., Bajramovic J.J., Schneider U., Ufano S., Pochet S., Gonzalez-Dunia D.** 2005: *Mechanism of the Antiviral Action of 1-Beta-D-Arabinofuranosylcytosine on Borna Disease Virus.* Journal of Virology Vol.79, No.7: 4514-4518.
65. **Watanabe Y., Ibrahim M., Hagiwara K., Okamoto M., Kamitani W., Yanai H., Ohtaki N., Hayashi Y., Taniyama H., Ikuta K., Tomonaga K.** 2007: *Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility.* Microbes and Infection Vol.9: 417-427.
66. **Weissenböck H., Bakonyi T., Sekulin K., Ehrensperger F., Doneley R., Dürrwald R., Hoop R., Erdélyi K., Gál J., Kolodziejek J., Nowotny N.** 2009: *Avian Bornaviruses in Psittacine Birds from Europe and Australia with Proventricular Dilatation Disease.* Emerging Infectious Diseases Vol.15, No.9: 1453-1456.
67. **Wensmann JJ., Thoren P., Hakhverdyan M., Belàk S., Berg M.** 2007: *Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus.* Journal of Virological Methods Vol.143: 1-10.
68. **Wood F & Bloor M.** 2006: *Borna disease virus: The generation and review of a scientific study.* Social Science & Medicine Vol.63: 1072-1083.
69. www.lacellula.net/appunti/immunologia/immunofluorescenza-citofluorimetria.html

Tabella – sieroprevalenze per BDV in sieri umani (indagini effettuate con tecniche diverse da laboratori diversi)

Paese	Diagnosi o gruppo di soggetti testati	Numero di pazienti testati	% Siero positività	Test	References
USA	<i>Major depressive disorders</i>	265	4,5	IFA	Amsterdam <i>et al.</i> , 1985
	Volontari sani	105	0		
Germania	Vari disturbi psichiatrici	694	0,6	IFA	Rott <i>et al.</i> , 1985
	Volontari sani	95	0		
Germania	Vari disturbi psichiatrici	1.003	6,8	IFA	Bechter <i>et al.</i> , 1987
	Pazienti chirurgici	133	3,5		
Germania	HIV infetti	460	7,8	IFA	Bode <i>et al.</i> , letter, 1988
	HIV sieronegativi	125	1,6		
	HIV sieronegativi tossicodipendenti	106	3,8		
USA, Germania, Giappone	Pazienti neurologici o psichiatrici	5.000	4,7	IFA	Rott <i>et al.</i> , 1991
	Pazienti di controllo da ospedali	1.000	1		
Est Africa	Schistosomiasi e malaria	193	9,8	IFA	Bode <i>et al.</i> , 1992
Germania	Pazienti psichiatrici	2.377	5,9	IFA	Bechter <i>et al.</i> , 1992
	Pazienti chirurgici	569	3,5		
Europa	HIV positivi asintomatici	1.024	7,1	IFA, IP	Bode <i>et al.</i> , 1992
	HIV infetti	244	13,99		
	HIV sieronegativi donatori	118	2,5		
USA	<i>Major depression</i>	550	2,2	IFA, IP	Bode <i>et al.</i> , 1992
	Pazienti chirurgici	365	2,2		
Germania	Pazienti psichiatrici in fase acuta (<i>follow-up study</i>)	71	19,7	IFA	Bode <i>et al.</i> , 1993
Germania	MS	50	0	IFA	Kitze <i>et al.</i> , 1996
Giappone	Pazienti psichiatrici	346	0,9	IFA	Kubo <i>et al.</i> , 1997
	Controlli sani	70	0		
Svizzera	HIV	16	12,5	IFA	Bachmann <i>et al.</i> , 1999
	ADC	25	8		
Germania	Pazienti psichiatrici	27	14,8	IFA	Vahlenkamp <i>et al.</i> , 2000
	Controlli sani	13	0		

Tabella – continua (II)

Paese	Diagnosi o gruppo di soggetti testati	Numero di pazienti testati	% sieropositività	Test	References
Suriname	Pazienti schizofrenici	29	3	IFA	Selten <i>et al.</i> , 2000
	Volontari sani	26	6		
USA	<i>Major depression</i>	138	6,5	IFA	Fu <i>et al.</i> , 1993
	Controlli sani	117	0,85		
USA	Pazienti schizofrenici	90	14,4	IFA	Waltrip <i>et al.</i> , 1995
	Controlli sani	20	0		
Giappone	Pazienti psichiatrici	60	30	IFA	Kishi <i>et al.</i> , 1995
Germania	Disordini psichiatrici vari	416	9,6	IFA	Sauder <i>et al.</i> , 1996
	Pazienti chirurgici	203	1,4		
Giappone	Schizofrenia	67	45,0	IFA	Iwahashi <i>et al.</i> , 1997
	Staff medico	26	0		
Taiwan	Schizofrenici	314	12,1	IFA	Chen <i>et al.</i> , 1999
	Schizofrenici asintomatici / famigliari	132	12,1		
	Donatori di sangue, altri pazienti	274	2,9		
Giappone	Pazienti psichiatrici	89	0	IFA	Tsuji <i>et al.</i> , 2000
	Volontari sani	210	0		
Thailandia	HIV sieropositivi asintomatici	60	15	ELISA	Auwanit <i>et al.</i> , 1996
	AIDS	67	17,9		
	HIV sieronegativi	103	2,5		
Giappone	Donatori di sangue	100	1	ELISA, WB	Kishi <i>et al.</i> , 1995
Giappone	Donatori di sangue viventi vicino a scuderie	428	2,6-14,8	ELISA	Takahashi <i>et al.</i> , 1997
	Donatori di sangue	100	1		
Giappone	Schizofrenia cronica	70	0	RS-ELISA	Horimoto <i>et al.</i> , 1997
	Volontari sani	40	0		

Tabella - continua (III)

Paese	Diagnosi o gruppo di soggetti testati	Numero di pazienti testati	% sieropositività	Test	References
Giappone	Schizofrenia	845	3,08	ECLIA	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1999
	Mood disorders	251	3,59		
	Altri disordini psichiatrici	366	0,55		
	Malattie neurologiche	114	0		
	Malattie oculari	1.393	1,36		
	Pazienti multitrasmessi	66	4,55		
	Donatori di sangue	917	1,09		
	HIV infetti	85	1,18		
	CFS	75	0		
	Epilettici	214	1,4		
	Malattie autoimmuni	50	0		
	Lebbra	17	0		
	Polonia	Vari disturbi psichiatrici	816		
Svezia	CFS	169	0	ELISA, WB	Evengard <i>et al.</i> , 1999
	Controlli	62	0		
Giappone	Mood disorder	45	4	IFA, ECLIA, WB	Fukuda <i>et al.</i> , 2001
	Schizofrenia	45	9		

Sieroprevalenze per BDV in sieri umani (indagini svolte in diverse nazioni, in diversi laboratori, con differenti tecniche diagnostiche tra il 1985 e il 2001)(Codazza D. & Nativi D. 2005).

Allegato 2 sezione TN

PROVINCIA	LOCALITA' AZIENDA	COORDINATE GEOGRAFICHE		ALTITUDINE	TERRITORIO	UBICAZIONE AZIENDA	NUMERO EQUIDI TESTATI PER AZIENDA	DATI CAVALLO		
		LAT NORD	LONG EST					ETA'	SESSO	RAZZA
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	13	F	Q.H.
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	10	MC	AVELIGNESE
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	10	F	AVELIGNESE
TN	RUMO	46°26'32.28"	11°1'10.56"	944	MM	C	1	8	F	MTC
TN	VALSORDA	46°4'45.48"	11°7'48.72"	565	MM	C	3	16	F	PSA
								19	MC	PSA
								16	MC	PSA
TN	BONDONE	45°48'26.64"	10°33'4.68"	720	MM	C	2	15	MC	PSI
								9	M	PSI
TN	TRENTO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	2	6	MC	PAINT
								15	F	Q.H.
TN	TRENTO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	2	8	F	ARABO
								13	M	Q.H.
TN	TRENTO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	3	2	F	AVELIGNESE
								1	M	AVELIGNESE
								1	F	AVELIGNESE
TN	TERLAGO	46°5'54.24"	11°2'48.48"	456	C	C	3	17	F	Q.H.
								7	F	Q.H.
								17	F	Q.H.
TN	MARTIGNANO	46°4'45.48"	11°7'48.72"	194	P	U	3	10	F	PSI
								6	F	PSA
								16	F	PSI
TN	BASELGA DI PINE'	46°7'40.44"	11°14'42.72"	964	MM	C	3	5	F	ANDALUSO
								14	F	MTC
								1	F	MTC
TN	BASELGA DI PINE'	46°7'40.44"	11°14'42.72"	964	MM	C	1	13	F	AVELIGNESE
TN	BASELGA DI PINE'	46°7'40.44"	11°14'42.72"	964	MM	C	1	6	F	ARGENTINO
TN	LEVICO TERME	46°0'49.68"	11°18'29.52"	506	MM	U	2	10	F	PALOMINO
								11	M	Q.H.
TN	LEVICO TERME	46°0'49.68"	11°18'29.52"	506	MM	U	4	17	MC	MTT
								25	MC	MTT
								2	MC	PONY
								2	F	PONY
TN	LEVICO TERME	46°0'49.68"	11°18'29.52"	506	MM	U	3	5	F	Q.H.
								8	F	Q.H.
								12	F	PAINT
TN	CALDONAZZO	45°59'45.24"	11°15'56.52"	480	C	C	3	9	MC	AVELIGNESE
								12	MC	ARGENTINO
								9	MC	AVELIGNESE
TN	CALDONAZZO	45°59'45.24"	11°15'56.52"	480	C	C	1	16	F	Q.H.

TN	CALDONAZZO	45°59'45.24"	11°15'56.52"	480	C	C	4	9	F	PAINT
								12	F	Q.H.
								16	F	MTC
								9	MC	PONY
TN	MOENA	46°22'41.52"	11°39'43.56"	1184	M	C	1	24	F	Q.H.
TN	PIEVE DI TESINO	46°4'8.76"	11°36'40.68"	843	MM	C	2	10	F	NORICO
								1	F	NORICO
TN	CAVEDINE	45°59'45.96"	10°58'28.56"	504	MM	C	1	4	F	AVELIGNESE
TN	TORCEGNO	46°4'30.72"	11°27'2.88"	769	MM	U	3	20	F	PAINT
								6	F	CRIOLLO
								4	M	CRIOLLO
TN	GRIGNO	46°1'0.84"	11°38'16.44"	263	P	C	2	12	F	ANDALUSO
								6	F	SELLA ITA
TN	CASTEL TESINO	46°3'51.84"	11°38'0.24"	871	MM	C	3	18	F	AVELIGNESE
								6	F	AVELIGNESE
								4	MC	MTC
TN	RONZO CHIENIS	45°53'25.80"	10°57'3.96"	974	MM	C	4	6	F	Q.H.
								8	F	Q.H.
								12	M	PAINT
								21	F	PAINT
TN	CEMBRA	46°10'28.56"	11°13'18.48"	667	MM	C	3	13	F	MTC
								10	F	ARGENTINO
								10	M	PAINT
TN	ARCO	45°55'14.88"	10°53'8.88"	91	P	U	1	9	MC	APPALOOSA
TN	CAVALESE	46°17'32.64"	11°27'37.44"	1000	M	C	1	5	F	Q.H.
TN	CAVALESE	46°17'32.64"	11°27'37.44"	1000	M	C	1	2	F	MTC
TN	VILLA RENDENA	46°3'45.36"1	10°42'43.56"	608	MM	C	1	10	F	AVELIGNESE
TN	TRES	46°19'26.40"	11°5'52.44"	810	MM	C	1	5	MC	Q.H.
TN	TRES	46°19'26.40"	11°5'52.44"	810	MM	C	1	3	F	Q.H.
TN	SPORMINORE	46°14'15.72"	11°1'52.68"	515	MM	C	1	3	F	AVELIGNESE
TN	SARNONICO	46°25'13.08"	11°8'34.08"	963	MM	U	1	5	F	PSA
TN	MORI	45°51'4.68"	10°58'54.12"	204	P	U	1	4	F	AVELIGNESE
TN	CENTA SAN NICOLO'	45°58'12.72"	11°14'0.24"	830	MM	C	1	6	F	Q.H.
TN	CIVEZZANO	46°5'32.64"	11°11'0.24"	469	C	C	1	4	F	Q.H.
TN	TERZOLAS	46°3'18.36"	11°31'45.84"	356	C	C	2	6	F	PSA
								18	F	PSA
TN	TON	46°15'58.32"	11°5'20.40"	482	C	C	2	11	F	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
TN	VILLA AGNEDO	46°3'18.36"	11°31'45.84"	356	C	C	2	19	F	ARGENTINO
								1	F	PAINT
TN	TRANSACQUA	46°10'21.36"	11°49'54.12"	746	MM	C	3	10	F	ARABO
								6	F	ARABO
								8	F	AVELIGNESE
TN	ZIANO DI FIEMME	46°17'14.64"	11°34'1.20"	953	MM	C	1	2	MC	TPR

TN	COREDO	46°21'6.12"	11°5'23.28"	831	MM	C	2	17	F	Q.H.
								11	F	Q.H.
TN	COREDO	46°21'6.12"	11°5'23.28"	831	MM	C	4	22	MC	AVELIGNESE
								18	F	PAINT
								5	MC	AVELIGNESE
								4	F	AVELIGNESE
TN	POZZA DI FASSA	46°25'10.20"	11°40'27.84"	1382	M	C	1	4	F	Q.H.
TN	STORO	45°51'3.24"	10°34'37.92"	409	C	C	1	5	F	MERENS
TN	VARENA	46°18'27.36"	11°27'33.48"	1180	M	C	1	10	F	AVELIGNESE
TN	AMBLAR	46°23'46.68"	11°8'52.08"	980	MM	C	4	4	M	AVELIGNESE
								7	MC	AVELIGNESE
								20	MC	BARDIGIANO
								18	MC	AVELIGNESE
TN	SOPRAMONTE	46°4'45.48"	11°7'48.72"	623	MM	U	3	21	MC	ARABO
								14	F	SELLA ITA
									F	ARABO
TN	TELVE	46°4'19.92"	11°28'50.16"	550	MM	C	4	13	F	FRISONE
								7	F	AVELIGNESE
								8	F	AVELIGNESE
								4	F	MTC
TN	DAIANO	46°18'9.00"	11°27'0.36"	1160	M	C	2	7	F	Q.H.
								11	MC	PAINT
TN	ROVERETO	45°53'25.80"	11°2'22.92"	204	P	U	2	21	MC	Q.H.
								14	MC	ARABO
TN	DIMARO	46°19'37.56"	10°52'18.48"	766	MM	C	4	2	F	Q.H.
								13	F	Q.H.
								9	F	PAINT
								5	F	PAINT
TN	RABBI	46°24'4.32"	10°50'48.12"	1095	M	C	1	12	F	T.P.R.
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	2	11	F	Q.H.
								20	F	Q.H.
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	1	17	F	ARABO
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	1	5	F	Q.H.
TN	BORG VALSUGANA	46°3'8.28"	11°27'19.44"	380	C	U	2	17	F	AVELIGNESE
								9	F	AVELIGNESE
TN	MALE'	46°21'9.00"	10°54'50.04"	738	MM	U	1	7	F	PAINT
TN	RONCHI	46°4'9.48"	11°26'10.32"	776	MM	C	1	10	M	Q.H.
TN	SPERA	46°4'16.32"	11°30'36.00"	553	MM	C	1	20	F	Q.H.
TN	SPERA	46°4'16.32"	11°30'36.00"	553	MM	C	1	14	F	MTC
TN	CAVIZZANA	46°22'5.16"	10°57'33.12"	710	MM	C	3	5	F	PSA
								2	F	ARABO
								11	MC	ARABO
TN	TESERO	46°17'28.68"	11°30'46.80"	1000	M	C	1	2	M	NORICO

TN	TESERO	46°17'28.68"	11°30'46.80"	1000	M	C	4	3	MC	Q.H.
								2	M	Q.H.
								7	F	Q.H.
								3	MC	AVELIGNESE
TN	TESERO	46°17'28.68"	11°30'46.80"	1000	M	C	4	3	MC	MTC
								7	F	MTC
								5	F	AVELIGNESE
								14	F	AVELIGNESE
TN	CLES	46°21'57.60"	11°2'2.40"	658	MM	C	2	1	F	Q.H.
								6	MC	ARGENTINO
totale soggetti campionati nella provincia di Trento							137			

Allegato 2 sezione BZ

PROVINCIA	LOCALITA' AZIENDA	COORDINATE GEOGRAFICHE		ALTITUDINE	TERRITORIO	UBICAZIONE AZIENDA	NUMERO EQUIDI TESTATI PER AZIENDA	DATI CAVALLO		
		LAT NORD	LONG EST					ETA'	SESSO	RAZZA
BZ	APPIANO	46°27'20.16"	11°15'46.08"	416	C	C	2	10	F	AVELIGNESE
								10	F	AVELIGNESE
BZ	APPIANO	46°27'20.16"	11°15'46.08"	416	C	C	3	9	F	MERENS
								17	F	MERENS
								17	MC	AVELIGNESE
BZ	SLUDERNO	46°39'55.44"	10°35'9.60"	921	MM	C	1	3	M	Q.H.
BZ	MALLES VENOSTA	46°41'19.68"	10°32'51.36"	1051	M	C	1	2	M	AVELIGNESE
BZ	S. MARTINO IN BADIA	46°40'56.64"	11°53'56.76"	1135	M	C	1	3	M	AVELIGNESE
BZ	ANTERIVO	46°16'45.84"	11°22'2.28"	1209	M	C	1	10	F	AVELIGNESE
BZ	PARCINES	46°41'6.36"	11°4'27.84"	626	MM	C	1	8	F	AVELIGNESE
BZ	S. LEONARDO IN PASSIRIA	46°48'49.32"	11°14'48.48"	689	MM	C	1	4	M	AVELIGNESE
BZ	S. LEONARDO IN PASSIRIA	46°48'49.32"	11°14'48.48"	689	MM	C	4	10	F	AVELIGNESE
								5	F	AVELIGNESE
								19	F	AVELIGNESE
								18	F	ARABO
BZ	S. MARTINO IN PASSIRIA	46°47'5.28"	11°13'41.88"	597	MM	C	1	9	F	AVELIGNESE
BZ	VAL DI VIZZE	46°54'3.24"	11°27'57.96"	948	MM	C	3	2	MC	AVELIGNESE
								10	MC	AVELIGNESE
								6	MC	AVELIGNESE
BZ	SENALES	46°42'24.84"	10°54'34.20"	1327	M	C	1	4	F	AVELIGNESE
BZ	SENALES	46°42'24.84"	10°54'34.20"	1327	M	C	1	3	F	AVELIGNESE
BZ	LUSON	46°44'49.56"	11°45'43.20"	972	MM	C	1	5	F	AVELIGNESE
BZ	VIPITENO	46°53'36.24"	11°25'51.96"	948	MM	U	4	2	M	AVELIGNESE
								2	M	AVELIGNESE
								2	M	AVELIGNESE
								3	M	AVELIGNESE
BZ	VELTURNO	46°40'6.24"	11°35'45.96"	851	MM	C	1	4	F	PSA
BZ	BRENNERO	46°56'20.40"	11°26'36.60"	1098	M	U	1	2	M	PAINT
BZ	DOBBIACO	46°43'32.88"	12°13'19.56"	1256	M	U	1	26	F	MTC
BZ	DOBBIACO	46°43'32.88"	12°13'19.56"	1256	M	U	1	4	MC	ARABO
BZ	BRAIES	46°43'15.96"	12°8'3.84"	1213	M	C	1	11	F	AVELIGNESE
BZ	ANTERSELVA	46°46'45.84"	12°2'53.88"	1030	M	C	4	25	F	MTC
								11	F	AVELIGNESE
								8	M	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
BZ	ANTERSELVA	46°46'45.84"	12°2'53.88"	1030	M	C	2	7	MC	BARDIGIANO
								3	MC	AVELIGNESE
BZ	VERANO	45°41'22.56"	9°13'32.16"	264	P	C	2	4	F	AVELIGNESE
								5	F	AVELIGNESE

BZ	PRATO ALLO STELVIO	46°37'11.64"	10°35'32.64"	915	MM	C	2	25	F	ARGENTINO
								7	F	ARGENTINO
BZ	S.PANCRAZIO	46°35'9.96"	11°5'13.92"	735	MM	C	4	2	F	AVELIGNESE
								6	MC	AVELIGNESE
								9	MC	AVELIGNESE
								3	M	AVELIGNESE
BZ	S.PANCRAZIO	46°35'9.96"	11°5'13.92"	735	MM	C	2	8	F	AVELIGNESE
								11	F	AVELIGNESE
BZ	ULTIMO	46°32'57.12"	11°0'18.72"	1190	M	C	1	11	M	AVELIGNESE
BZ	SAN CANDIDO	46°44'2.04"	12°16'47.64"	1175	M	C	1	2	F	AVELIGNESE
BZ	FIE'	46°31'3.36"	11°30'8.28"	880	MM	C	1	8	F	AVELIGNESE
BZ	FIE'	46°31'3.36"	11°30'8.28"	880	MM	C	1	14	F	Q.H.
BZ	CASTELROTTO	46°34'3.00"	11°33'43.20"	1060	M	C	3	16	F	ARABO
								3	F	AVELIGNESE
								11	F	ARABO
BZ	CASTELROTTO	46°34'3.00"	11°33'43.20"	1060	M	C	1	4	M	AVELIGNESE
BZ	CASTELROTTO	46°34'3.00"	11°33'43.20"	1060	M	U	3	1	F	AVELIGNESE
								16	F	AVELIGNESE
								9	F	AVELIGNESE
BZ	CALDARO	46°24'50.76"	11°14'31.92"	425	C	C	1	6	M	MTC
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	2	5	F	SELLA ITA
								4	F	SELLA ITA
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	1	14	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	2	16	MC	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	1	10	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	2	7	F	AVELIGNESE
								8	F	AVELIGNESE
BZ	S GENESIO ATESINO	46°32'12.12"	11°19'50.16"	1087	M	C	3	3	F	QH
								5	F	AVELIGNESE
								6	F	AVELIGNESE
BZ	LANA	46°28'57.00"	11°57'18.00"	1475	M	U	1	3	F	AVELIGNESE
BZ	LANA	46°28'57.00"	11°57'18.00"	1475	M	C	1	15	M	FRISONE
BZ	VILLANDRO	46°37'54.12"	11°32'17.16"	880	MM	C	4	10	F	AVELIGNESE
								8	F	MTC
								5	M	AVELIGNESE
								14	F	AVELIGNESE
BZ	MERANO	46°40'8.40"	11°9'44.28"	325	C	U	1	7	M	PSI
BZ	MERANO	46°40'8.40"	11°9'44.28"	325	C	U	1	15	MC	PSI
BZ	SILANDRO	46°37'45.48"	10°46'19.92"	721	MM	C	1	8	F	AVELIGNESE
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	1	6	M	AVELIGNESE

BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	4	14	F	AVELIGNESE
								2	M	AVELIGNESE
								13	F	AVELIGNESE
								8	F	PAINT
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	1	19	F	TPR
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	3	6	F	AVELIGNESE
								17	F	AVELIGNESE
								3	MC	AVELIGNESE
BZ	RENON	46°32'32.64"	11°27'29.88"	1.154	M	C	1	3	F	AVELIGNESE
BZ	MOSO IN PASSIRIA	46°49'58.80"	11°10'3.00"	1007	M	C	1	3	F	MTC
BZ	BRESSANONE	46°42'35.28"	11°39'26.64"	559	MM	C	1	17	F	AVELIGNESE
BZ	BRESSANONE	46°42'35.28"	11°39'26.64"	559	MM	U	4	5	M	SELLA ITA
								4	M	SELLA ITA
								3	F	HANNOVER
								3	F	ANDALUSO
BZ	CHIUUSA	46°38'36.24"	11°34'22.80"	523	MM	C	4	4	F	AVELIGNESE
								10	F	AVELIGNESE
								11	M	AVELIGNESE
								6	F	AVELIGNESE
BZ	VALLE AURINA	46°59'49.56"	11°58'51.24"	1054	M	C	1	12	M	AVELIGNESE
BZ	CAMPO TURES	46°55'16.32"	11°57'19.80"	864	MM	C	1	6	F	AVELIGNESE
BZ	SELVA DEI MULINI	46°53'30.48"	11°51'40.32"	1229	M	C	2	17	F	AVELIGNESE
								11	M	AVELIGNESE
BZ	BOLZANO	46°29'36.96"	11°20'4.56"	262	P	U	2	3	M	PSA
								3	F	PSA
BZ	BADIA	46°36'39.60"	1°53'40.20"	1315	M	C	2	12	F	AVELIGNESE
								15	F	MTC
BZ	BADIA	46°36'39.60"	1°53'40.20"	1315	M	C	1	18	F	AVELIGNESE
BZ	NATURNO	46°38'58.56"	11°0'21.96"	528	MM	C	2	21	F	TPR
								4	F	NORICO
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	1	5	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	2	6	F	AVELIGNESE
								12	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	2	8	F	AVELIGNESE
								7	F	Q.H.
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	1	14	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	4	12	F	MTC
								5	F	AVELIGNESE
								11	F	AVELIGNESE
								4	F	AVELIGNESE
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	1	7	M	PSI
BZ	SARENTINO	46°38'39.84"	11°21'24.48"	961	MM	C	2	4	M	ARGENTINO
								4	M	ARGENTINO

BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	2	2	M	CRIOLLO
								10	F	PAINT
BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	3	10	F	AVELIGNESE
								5	M	AVELIGNESE
								3	F	AVELIGNESE
BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	2	10	F	AVELIGNESE
								10	F	AVELIGNESE
BZ	RIO DI PUSTERIA	46°47'55.32"	11°40'8.76"	777	MM	C	1	16	F	AVELIGNESE
BZ	SESTO	46°42'11.88"	12°21'3.60"	1310	M	C	4	10	M	AVELIGNESE
								5	M	AVELIGNESE
								11	F	AVELIGNESE
								7	M	AVELIGNESE
BZ	FUNES	46°38'37.32"	11°40'45.48"	1132	M	C	1	13	F	AVELIGNESE
BZ	FUNES	46°38'37.32"	11°40'45.48"	1132	M	C	2	2	F	MTC
								6	M	AVELIGNESE
BZ	MAREBBE	46°41'57.48"	11°56'9.96"	1285	M	C	2	13	F	AVELIGNESE
								2	F	AVELIGNESE
totale soggetti campionati nella provincia di Bolzano							140			

Centro di Referenza per le Malattie degli Equini (CERME)
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana – ROMA

**Scheda anagrafica e di accompagnamento campioni
ricerca degli anticorpi per il Virus di BORNA
(da allegare alla scheda per l'Anemia Infettiva Equina - AIE)**

Numero del verbale di prelievo _____
Numero di registrazione della scheda AIE di riferimento (per il laboratorio)

ATTRIBUTI DELLA AZIENDA SEDE DI PRELIEVO

Coordinate geografiche (Sistema WGS84, gradi decimali): **Lat. Nord** _____

Long. Est _____

Altitudine sul livello del mare (altimetria) mt. _____ aslm

Ubicazione* Pianura Collina (300-500 mt) Mezza montagna (500 – 1000mt)
Montagna (>1000 mt)

**indicativa, se è assente precisa altimetria*

Gli equidi sono detenuti all'aperto in paddock esterni recinto all'aperto pascolo

Ubicazione azienda zona urbana campagna

Numero di equidi sottoposti a prelievo N _____

Progressivi relativi alla scheda AIE dei cavalli sottoposti a prelievo anche per virus BORNA (max 4 equidi per azienda)

Campione progr. N° _____

Campione progr. N° _____

Campione progr. N° _____

Campione progr. N° _____

Indicare chiaramente nella scheda AIE l'anno di nascita dei cavalli sottoposti a prelievo per BORNA

IMMUNOFLUORESCENZA

L'immunofluorescenza è una delle tecniche più usate tra le reazioni sierologiche, di fondamentale importanza in microbiologia, immunologia, o comunque nel laboratorio biomedico, per rilevare in un certo campione la presenza di specifici antigeni od anticorpi ignoti la cui controparte nota (quella a disposizione del ricercatore o laboratorista) è variamente legata ad un marcatore. Il marcatore è un fluorocromo, ovvero un colorante che assorbendo onde ad alta frequenza (ultravioletti) emette nel visibile. Il fluorocromo più impiegato è l'isotiocianato di fluorescina (o semplicemente fluorescina) che assorbendo raggi ultravioletti, con l'ausilio di un microscopio illuminato da una fonte adatta, emette luce verde. Esistono due principali metodiche che utilizzano il principio dell'immunofluorescenza, quella diretta e quella indiretta.

- IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA

Quando si cerca un antigene corpuscolato ignoto (batterio, cellula, ...), si fissa con apposite metodiche l'antigene al vetrino (o pozzetto), poi si mettono a contatto i presunti anticorpi specifici marcati con fluorescina (eventualmente usando diversi anticorpi in ricerche successive). Si lascia a contatto per il tempo necessario all'interazione antigene-anticorpo, poi si lava accuratamente. In questo modo gli anticorpi fluorescenti non legati vengono eliminati. Se al microscopio si visualizzano corpuscoli fluorescenti (verdi brillanti), su sfondo scuro, significa che nel campione in esame era presente l'antigene e che esso è stato identificato mediante la reazione Ag-Ab utilizzando un antisiero specifico coniugato con fluoresceina. Tale tecnica non permette però di ricercare anticorpi specifici in un siero prelevato da un soggetto. A tal fine si utilizza l'immunofluorescenza indiretta.

- IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA

Viene usata per ricercare un antigene od un anticorpo ignoto.

Per la ricerca dell'antigene ignoto (Ag?), dopo averlo fissato con opportune metodiche al pozzetto, si mette a contatto con un antisiero specifico (conosciuto) non marcato (Ab I); si formerà l'eventuale immunocomplesso primario. Con dei lavaggi si portano via tutti gli anticorpi che non si sono legati. Si aggiunge poi un altro antisiero anti-immunoglobuline

specifico nei confronti delle specie di origine del siero primario, marcato con fluorescina (ovvero anticorpi anti-anticorpi Ab Ig II*); se nel preparato sono rimasti anticorpi dopo il primo lavaggio, avremo la formazione di un immunocomplesso secondario (cioè gli Ab Ig II* si legheranno agli Ab I che si erano legati all'Ag). Si effettua un secondo lavaggio. Se si osserva il preparato all'ultravioletto e si noterà la fluorescenza significa che l'antigene presente nel materiale in esame è quello per l'anticorpo specifico Ab I.

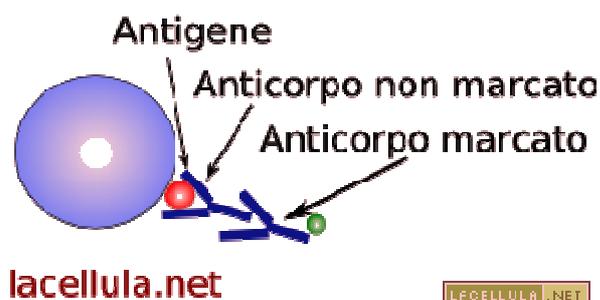


Fig.15 Nell'IFA un anticorpo non marcato si lega all'antigene formando il complesso antigene-anticorpo. A questo complesso, e più precisamente nel frammento FC, si lega a sua volta un anticorpo marcato con la fluorescina o con la rodamina. Questo sistema è definito anticorpo anti-anticorpo per indicare che l'immunoglobulina non reagisce contro l'antigene bensì contro un'altra immunoglobulina che l'ha riconosciuto (www.lacellula.net).

Nella ricerca **dell'anticorpo ignoto** (Ab?), si mette il siero in esame a contatto con antigeni noti (Ag) fissati ad un vetrino, in questo modo si formerà l'eventuale immunocomplesso primario. Dopo un accurato lavaggio, si aggiunge un antisiero anti-immunoglobuline, della specie da cui proviene il siero in esame, marcato con fluorescina (Ab Ig II*); se nel preparato sono rimasti anticorpi dopo il primo lavaggio, avremo la formazione di un immunocomplesso secondario (cioè gli Ab Ig II* si legheranno agli Ab? che si erano legati all'Ag noto). Si effettua un secondo lavaggio e si osserva il preparato all'ultravioletto: se si nota la fluorescenza significa che l'anticorpo ricercato è specifico per l'antigene a noi noto (www.lacellula.net).

IL MICROSCOPIO A FLUORESCENZA

Dopo aver preparato il substrato formato dal complesso antigene-anticorpo marcato attraverso il microscopio a fluorescenza è possibile osservare la sua localizzazione. Il funzionamento del microscopio a fluorescenza è molto intuitivo in quanto, in una prima fase, emette un fascio di luce infrarossa (<750nm) che colpisce il preparato. La caratteristica del marcatore fluorescente è che assorbe la luce e, grazie a reazioni di ossidoriduzione, la restituisce con un livello energetico superiore. Secondo l'equazione d'onda della luce all'aumentare dell'energia diminuisce la lunghezza d'onda per cui dai

750nm dell'infrarosso il complesso riemette luce con lunghezza d'onda pari a circa 700nm (luce rossa) o 530nm(luce verde) .

I vantaggi dell'immunofluorescenza indiretta sono:

- ✓ la sua semplicità e rapidità di esecuzione.
- ✓ la sua buona sensibilità che permette di individuare rapidamente i campioni negativi (che in genere sono la maggioranza).
- ✓ la grande economicità di gestione, pur considerando l'ammortamento delle apparecchiature richieste.

Gli svantaggi dell'immunofluorescenza indiretta sono:

- ✓ la necessità di personale tecnico esperto per la preparazione dei substrati e di una dotazione di apparecchiature abbastanza costose (criostato, congelatore a -70°C e microscopio a fluorescenza).
- ✓ un certo grado di soggettività dell'operatore al microscopio che determina il risultato positivo/negativo.
- ✓ l'essere un metodo semi-quantitativo.
- ✓ la relativa difficoltà a reperire certi substrati.