

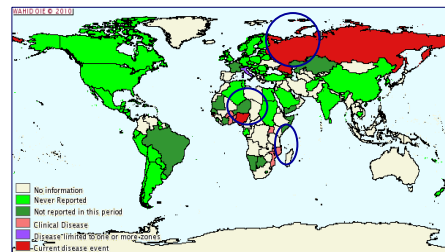
UPL REAL TIME PCR e LAMP: VALUTAZIONE COMPARATIVA DI NUOVE TECNICHE BIO-MOLECOLARI PER LA DIAGNOSI DI PESTE SUINA AFRICANA

Iscaro C. (1), Fernández-Pinero J. (2), Leblanc N. (3), Rossi E. (1), Giammaroli M. (1), De Mia G.M. (1)

(1) Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy.
 (2) Instituto Nacional de Investigacion Agraria y Alimentaria (CISA-INIA), Valdeolmos, Madrid, Spagna.
 (3) The National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden.

Introduzione

La peste suina africana (PSA) è una delle più importanti malattie del suino a motivo della sua capacità di rapida diffusione e delle gravi implicazioni nel commercio internazionale di animali e prodotti di origine animale. Dopo l'eradicazione dalla penisola Iberica (1995), la PSA è rimasta confinata nei paesi dell'area sub-sahariana e in Sardegna. Tuttavia, nell'ultimo decennio, l'epidemiologia e la distribuzione della malattia sono cambiate: sono, infatti, aumentati i focolai nei Paesi africani e, a partire dal 2007, la malattia è comparsa in alcuni paesi caucasici (Armenia, Georgia e Azerbaijan) e della Federazione Russa. La vicinanza dell'Unione Europea (UE) alle zone infette, la mancanza di reali punti di controllo frontaliere in tutta la Federazione Russa, l'endemizzazione dell'infezione in larga parte di questi territori e il coinvolgimento, seppur limitato, sia dei cinghiali, sia delle zecche, rendono questa malattia un potenziale rischio per l'UE. Non esiste un vaccino nei confronti di questa infezione e le strategie di controllo e di eradicazione della malattia sono basate esclusivamente sulla diagnosi di laboratorio e sulla rigida applicazione delle misure sanitarie.



Molte tecniche diagnostiche possono essere utilizzate in laboratorio per l'identificazione del virus della PSA. L'isolamento in colture primarie di leucociti suini è sensibile, ma richiede molti giorni e può dare dei falsi negativi nel caso di isolati non emoadsorbenti. L'ELISA-Ag può essere utilizzata solo come tecnica di screening e l'immunofluorescenza è particolarmente indicata nelle fasi acute della malattia. Molti test bio-molecolari, come la PCR convenzionale e la real-time PCR sono stati sviluppati negli ultimi anni e adottati per la diagnosi di routine. Recentemente sono state sviluppate nuove tecniche bio-molecolari quali la real-time PCR che utilizza la Universal ProbeLibrary (UPL) e la loop-mediated isothermal amplification (LAMP) che consente la diagnosi di PSA anche in laboratori non estremamente specializzati e può teoricamente essere impiegata come on-site test. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare comparativamente sia su campioni sperimentali che di campo, l'applicabilità di queste due nuove procedure bio-molecolari e definirne le caratteristiche di specificità, sensibilità e ripetibilità.

Materiali e Metodi

Stipiti di PSA appartenenti rispettivamente al genotipo I (60/SA/1979), II (Armenia 2007) e IX (Kenya 2005), sono stati utilizzati in diluizione logaritmica da tal quale (T.Q.) a 10^{-9} per valutare la sensibilità e il limite di rilevabilità delle singole metodiche. Un pannello di 32 isolati collezionati da suino e cinghiale infetti, costituito da sospensioni d'organo, sangue e sovrantanti cellulari, è stato utilizzato per verificare le *performances* della real-time PCR con probe UPL#162 e della metodica LAMP. Campioni negativi sono stati preparati da omogenati d'organo e sangue ottenuti da suini non infetti. L'estrazione del DNA virale è stata effettuata con il kit commerciale QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) secondo quanto indicato dal produttore. Due nuove tecniche di amplificazione sono state applicate e valutate mediante una analisi comparativa con la real-time PCR descritta da King *et al.* e raccomandata dal manuale OIE: (i) la real-time PCR che utilizza la Universal LibraryProbe #162 (UPL); (ii) la loop-mediated isothermal amplification (LAMP). (i) La UPL real-time PCR utilizza una coppia di primers specifica per un frammento del gene B646L che codifica per la proteina VP72 e una sonda a idrolisi di 8 nucleotidi marcata in FAM (UPL#162) (Roche-Applied Science). Il prodotto di amplificazione è di 68 bp. (ii) La loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (OptiGene Ltd, UK) è un nuovo saggio bio-molecolare in grado di produrre una rapida amplificazione, in condizioni isoterme, di una sequenza target del gene B646L. Utilizza 3 coppie di primers (F3/B3, FIP/BIP, LF/LB) prodotte mediante una Java-software disponibile sul sito della Eiken <http://primerexplorer.jp/e/>, in presenza di una DNA polimerasi con attività di *strand displacement*.

Figura 1 - Universal ProbeLibrary (UPL)

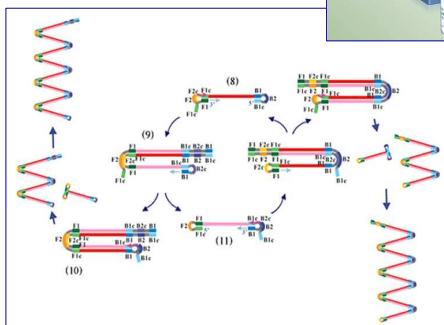


Figura 2 - Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP): le prime 2 coppie di primers, in presenza di una Taq con attività di *strand displacement*, amplificano strutture di varie misure contenenti repliche alternativamente invertite della sequenza target sullo stesso filamento; grazie all'attività dei Loop Primers, tutti i punti di ripiegamento possono essere usati come punti di partenza per la sintesi di DNA

Risultati

Diluiz. log.virus Isolato 60/SA/1979	real-time PCR OIE Ct medio	real-time UPL (#162) Ct medio	LAMP Ct medio
T.Q.	> 45	19,55	14,76
10 ⁻¹	> 45	19,57	16,74
10 ⁻²	31,10	22,16	20,31
10 ⁻³	30,40	25,48	23,91
10 ⁻⁴	33,20	29,15	27,70
10 ⁻⁵	37,00	33,14	31,78*
10 ⁻⁶	40,90	35,73	> 45
10 ⁻⁷	> 45	> 45	> 45
10 ⁻⁸	> 45	> 45	> 45
10 ⁻⁹	> 45	> 45	> 45

(*) Positività riscontrata solo in una replica

Tabella 1 - Sensibilità della real-time PCR OIE, UPL real-time PCR e LAMP su diluizioni logaritmiche di virus PSA genotipo I

Diagnosi (numero)	real-time PCR OIE Ct medio	real-time UPL (#162) Ct medio	LAMP Ct medio
7	37,10	29,16	35,02
9	> 45	22,53	18,71
37	> 45	> 45	> 45
137	> 45	> 45	> 45
41	27,22	23,24	22,92
42	27,49	20,72	19,40
142	> 45	29,19	21,15
43	28,76	24,52	25,30
143	> 45	29,96	20,44
44	24,15	20,07	22,87
45	29,02	24,01	31,46

Tabella 2 - Risultati della real-time PCR OIE, UPL real-time PCR e LAMP su campioni di cinghiali

Discussione

La real-time PCR OIE, la UPL real-time PCR e la LAMP hanno tutte mostrato ottime *performances* in termini di specificità, sensibilità e ripetibilità. In particolare, la UPL real-time PCR risulta essere specifica, sensibile e di rapida esecuzione. Rispetto alla real-time PCR OIE, ha mostrato *performances* superiori, essendo in grado di rilevare con più efficienza il DNA virale in campioni con inibenti (ad es. per eccessiva concentrazione di DNA o presenza di emoglobina) e in matrici critiche derivanti da animali selvatici. La LAMP si è rivelata un saggio in grado di produrre una rapida amplificazione di una sequenza di DNA target in modo altamente specifico ed in condizioni isoterme, mostrando quindi caratteristiche di semplicità e facilità di impiego. Ha il vantaggio di poter essere applicata in laboratori non specializzati e/o non dotati di strumentazioni complesse o addirittura in laboratori mobili. L'analisi comparativa tra LAMP e UPL real-time PCR ha mostrato che il limite di rilevabilità della prima è leggermente inferiore anche se la capacità di rilevare DNA virale in campioni con inibenti e in matrici critiche è sovrapponibile. In conclusione, si può affermare che UPL real-time PCR e LAMP siano da preferire per sensibilità e duttilità alle real time PCR convenzionali.