

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DI MALATTIE INFETTIVE DEL SUINO, DALLA PCR TRADIZIONALE AL SEQUENZIAMENTO DELL'AGENTE INFETTIVO RILEVATO.

PAOLO BONILAURI
BIOLOGO DIRIGENTE

IZSLER Sezione di Reggio Emilia, via Pitagora 2, 42124. paolo.bonilauri@izsler.it

INTRODUZIONE

La diagnostica delle malattie infettive viene di norma suddivisa in due tipologie, diretta o indiretta. Nella diagnostica diretta, viene ricercato l'agente eziologico *in toto* oppure vengono ricercati alcuni dei suoi componenti e la loro presenza è rilevata *direttamente* nel campione in esame. Nella diagnostica indiretta, vengono, invece, rilevati *anticorpi* nei confronti dell'agente eziologico. Numerose sono le tecniche molecolari che sono state applicate nella diagnostica diretta di malattie infettive nel corso degli ultimi 15 anni e anche in campo veterinario ed in particolare in diagnostica suina, il loro utilizzo è piuttosto comune e la possibilità di utilizzare queste tecniche è diffusa in tutti i laboratori veterinari a livello europeo. Le tecniche molecolari hanno come bersaglio della loro azione il rilevamento di porzioni di materiale genetico e la loro caratterizzazione, per cui sono certamente tecniche diagnostiche dirette. La reazione a catena della (DNA) polimerase, nota come PCR (Polymerase Chain Reaction) è stata sviluppata nel 1983 da Kary Mullis (USA, Berkeley University) bio-chimico, insignito del Premio Nobel per la Chimica nel 1993 per questa scoperta. Inoltre il Dr. Mullis è autore nel 1998 del libro intitolato "Ballando nudi nel campo della mente. Le idee (e le avventure) del più eccentrico tra gli scienziati moderni", un testo in cui tra le molte curiosità sulla vita di questo brillante scienziato, viene raccontato come soltanto attraverso l'utilizzo di droghe allucinogene l'autore è riuscito a raffigurare nella propria mente le molecole di DNA che venivano replicate nel corso della reazione da lui ideata e viene inoltre, riportata dall'autore una esperienza di incontro ravvicinato con una cultura aliena dalla quale lo stesso descrive di essere stato rapito a scopo di studio.

LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERARE (PCR)

Indubbiamente, la PCR è una reazione fondamentale per tutta la moderna biologia molecolare essendo alla base di praticamente ogni altra determinazione molecolare, sequenziamento del DNA compreso, per cui è soltanto grazie alla invenzione del Dr. Mullis che il genoma umano è stato recentemente completamente sequenziato. La ragione del successo della reazione di PCR e la sua grande diffusione in ogni laboratorio diagnostico a livello mondiale, sta nella sua elevata sensibilità analitica. La reazione è, infatti, in grado cioè di rilevare anche poche particelle di materiale genetico contenute all'interno del campione in analisi, con tempi di risposta estremamente brevi e teoricamente contenuti in una singola giornata lavorativa. Inoltre la metodica è estremamente duttile e può essere applicata per rilevare la presenza di qualunque agente patogeno di cui sia nota anche soltanto una piccola porzione di genoma. Parlando di caratteristiche intrinseche alle differenti metodiche di diagnostiche, non si può non introdurre alcuni concetti relativi alla validazione delle stesse. Quando si parla di validazione in campo diagnostico, il testo di riferimento può che manuale OIE per test diagnostici e vaccini per animali terricoli, nel capitolo 1.1.4/5, nella versione 2010. Per validazione di una metodica diagnostica si intende la misurazione di determinati parametri (bontà teorica per gli intenti prefissati, ottimizzazione, standardizzazione, robustezza, ripetibilità, sensibilità analitica, specificità analitica, determinazione del cut-off, sensibilità diagnostica e specificità diagnostica, riproducibilità e resilienza, cioè la capacità di resistere alle differenti condizioni

di riproducibilità) della metodica stessa atti a valutare quanto la metodica sia adatta a rilevare quello che interessa cercare nel campione in esame. Il processo di validazione di una metodica diagnostica è in processo progressivo e continuo e l'utilizzo stesso della metodica nel tempo consente di determinare con sempre maggior certezza le stime dei parametri considerati. Tra tutti i parametri da determinare nel corso di una validazione, quelli su cui vale la pena soffermarsi riguardo alla PCR, sono la Sensibilità e la Specificità analitica e diagnostica. La Sensibilità analitica (ASe), nota come limite di rilevazione o LOD (limit of detection) è la porzione minima di analita contenuta nel campione rilevabile dal metodo. Per le metodiche PCR questo limite di rilevazione è di solito compreso tra 10-100 copie di target per reazione, il che corrisponde a circa 100-1000 copie di target / ml o g di campione. La Specificità analitica (ASp), riguarda la capacità del metodo di individuare soltanto la presenza del materiale genetico dell'agente in ricerca e non altri a lui filogeneticamente correlati e si traduce nella specificità dei primer e delle condizioni di reazione delle metodiche PCR. La Sensibilità diagnostica (DSe), invece rimanda alla porzione di animali di riferimento sicuramente infetti classificati come positivi dal metodo (ed un altro modo di esprimere questo parametro è il tasso di falsi negativi del test). Infine per Specificità diagnostica (DSp), si intende la porzione di animali di riferimento sicuramente non infetti classificati come negativi dal metodo (ed un altro modo di esprimere questo parametro è il tasso falsi positivi del test).

Venendo specificatamente alla reazione PCR, questa per il suo espletamento richiede DNA/RNA sufficientemente puro da poter essere amplificato (e questo prende il nome di template). Per ottenere DNA/RNA da amplificare questo deve essere estratto, cioè isolato dal campione in analisi. L'estrazione è un processo chimico / fisico che permette di isolare l'acido nucleico da proteine e altri componenti cellulari presenti e avviene tramite rottura dei tessuti, lisi cellulare, lisi proteica o loro separazione dal DNA/RNA, precipitazione alcolica del materiale genetico e Ri - sospensione / eluizione del DNA/RNA in soluzione acquosa. Viene d'obbligo ricordare qui, che il bersaglio delle reazioni di PCR non sono i microrganismi (virus o batteri) di cui mette in luce la presenza, ma il loro materiale genetico in porzioni specifiche, ma molto limitate. Questo è anche il più grande svantaggio o il più grande limite di queste reazioni. La PCR essendo una tecnica distruttiva, non fornirà mai informazioni dirette sulla vitalità dei microrganismi di cui evidenzia la presenza nel campione in analisi.

Una volta estratto il materiale genetico deve essere messo a contatto con i differenti componenti di reazione che vanno sotto il nome di "mix di reazione" (acqua, tampone di reazione, primer, dNTP, MgCl₂, Enzima di polimerizzazione del DNA - *Taq*) ed i singoli campioni contenuti in apposite provette vengono trasferiti su di una macchina nota come termociclatore (fig.1). I termociclatori sono macchine da laboratorio in grado di modificare la temperatura delle mix di reazione contenute nelle singole provette rapidamente e secondo cicli prefissati dall'operatore. Ma veniamo a descrivere quello che avviene all'interno delle provette di reazione una volta posta sul termociclatore. Come si intuisce dal nome, la reazione a catena della polimerase è una reazione che si completa attraverso la ripetizione di cicli termici uguali tra loro. Le tre temperatura fondamentali di tutte le reazioni di PCR che vengono ripetute ad ogni ciclo sono (fig.2):

1. una elevata temperatura di solito compresa tra 94°C e 96°C in cui avviene la denaturazione fisica della doppia elica di DNA, cioè la separazione del duplex in due filamenti di DNA singoli.

2. A questa segue una temperatura di molti gradi inferiore (50°C e 65°C), nota come temperatura di annealing, in cui avviene l'appaiamento dei primer alle regioni a loro complementari. I primer, sono corte sequenze di DNA a singolo filamento (18-28 bp) che delimitano la regione che verrà amplificata durante la reazione. A questa temperatura i primer riconoscono specificatamente le regioni a loro complementari quando queste sono presenti nel campione in analisi e quindi, la temperatura di annealing rappresenta la chiave per la

specificità delle reazioni PCR, ma non solo per questa, anche la sensibilità delle reazioni PCR è influenzata dalla temperatura di annealing. Infatti se questa temperatura fosse troppo alta, i primer non riconoscerebbero le regioni a loro complementari anche quando queste fossero presenti (scarsa sensibilità), mentre se la temperatura di annealing fosse troppo bassa, i primer potrebbero riconoscere anche regioni solo in parte a loro complementari e consentire, in ultima analisi, l'amplificazione di target non specifici (falsi positivi). 3. Infine, la terza temperatura è una temperatura ottimale per gli enzimi di amplificazione del DNA utilizzati, che provenendo da batteri termoresistenti, hanno un ottimo di lavoro a temperature elevate. Nella maggior parte dei casi, l'enzima di amplificazione utilizzato è una DNA polimerasi termostabile isolata originariamente dal microrganismo termofilo *Thermus aquaticus* da cui prende il nome *Taq*. La temperatura di allungamento è quindi di solito impostata a 72°C ed a questa temperatura, l'enzima riconosce la presenza di un primer appaiato ad un singolo filamento di DNA e questo fornisce l'innescò per la polimerizzazione del DNA, cioè per la copia complementare del singolo filamento di DNA partendo dalla fine del primer. Ripetendo questa reazione in modo ciclico, è possibile in 30 cicli di reazione ottenere 2³⁰ copie del materiale genetico di partenza, delimitato dalle regioni specificatamente riconosciute dai primer e quindi evidenziare la teorica presenza anche di una singola copia di DNA del microrganismo in ricerca.

Al termine della reazione di PCR i prodotti della reazione vengono caricati su di un gel di agarosio. Applicando a questo un campo elettrico in presenza di un idoneo tampone elettroforetico e di un colorante (Et-Br, SYBR green ecc) in grado di intercalare il DNA durante o dopo la corsa elettroforetica, il DNA essendo un poli-anione migra verso il polo positivo ad una velocità che dipende dal peso molecolare del frammento. Posizionando il gel su di un transilluminatore a luce UV è possibile rilevare la presenza di una banda di amplificazione quando presente, grazie al fatto che, in queste condizioni, il colorante intercalato nel DNA emette fluorescenza visibile (fig.3).

DIFFERENTI TIPOLOGIE DI PCR E LORO APPLICAZIONI

La reazione di base è sempre questa per tutte le differenti tipologie di PCR, ma queste possono differire a seconda del materiale genetico di partenza o del numero di coppie di primer utilizzate in una singola reazione, ma vediamo alcune. Se l'agente eziologico di cui occorre evidenziare la presenza ha come materiale genetico RNA, dovrò estrarre dal campione di partenza RNA anziché DNA e poi retrotrascrivere il campione di RNA in cDNA (DNA copia complementare dell'RNA) tramite apposita reazione di retrotrascrizione (trascrittasi inversa). In questo caso, la PCR prende il nome di RT-PCR cioè una PCR preceduta da una reazione di Retrotrascrizione in vitro. Per ottenere questa copia complementare dell'RNA estratto in cDNA, si utilizzano enzimi di origine retrovirale che producono DNA su stampo RNA. La RT-PCR quindi è una metodica in due passaggi:

1. Retrotrascrizione RNA->cDNA
2. PCR partendo da cDNA retrotrascritto.

In diagnostica suina, la RT-PCR si applica principalmente nella ricerca di virus a RNA quali PRRSV, SIV, Coronavirus (PED, PRCV, TGE), EMCV.

La nested PCR (nPCR) o PCR annidata, è una doppia PCR eseguita sulla medesima regione di DNA. Schematicamente dal DNA estratto si esegue una prima PCR e dal prodotto della 1° PCR si esegue una 2° PCR annidata alla prima. La seconda coppia di primer si appaia ad una regione compresa all'interno del primo frammento di PCR ottenuto. La nPCR è una PCR che ha una sensibilità analitica almeno 10-100 volte superiore ad una singola PCR. Inoltre la nPCR è maggiormente specifica, 2 volte in due regioni differenti e annidate i primer devono riconoscere il DNA bersaglio, ma è più esposta a problemi sia di Sensibilità che di Specificità diagnostica (falsi positivi, dovuti ad inquinamento e falsi negativi dovuti alla variabilità

genetica dei ceppi). La nPCR in diagnostica suina si applica ogni qual volta si ritiene che la quantità di DNA/RNA bersaglio contenuta nel campione sia o molto scarsa o non facilmente amplificabile alcune applicazioni sono:

ricerca di *Lawsonia intracellularis* da feci, che rappresentano un materiale di partenza difficile da processare per la presenza di inibitori che diminuiscono la sensibilità delle reazioni singole, la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae* da tamponi nasali, dove si sa che anche quando positivi, sono presenti pochi microrganismi oppure la ricerca di PRRSV da seme, dove si sommano i due problemi, presenza di possibili inibitori e poche particelle virali presenti.

La multiplex PCR è una tecnica che in realtà consiste in più PCR eseguite contemporaneamente all'interno della stessa provetta. In queste metodiche, invece di una coppia di primer se ne mettono due o più di due coppie. Le multiplex PCR rilevano contemporaneamente tanti target quante coppie di primer sono state inserite nella reazione. Permettendo di rilevare, differenti target di PCR contemporaneamente, prometterebbe minori costi e minori tempi di risposta e offrirebbe la possibilità di effettuare screening ad ampio spettro per più patogeni. Purtroppo le multiplex PCR hanno un grosso limite, che sta nella minore sensibilità delle multiplex rispetto alle singole PCR, che compongono la reazione. Di fatto le multiplex vengono applicata soltanto quando non è richiesta elevata sensibilità di reazione come nella tipizzazione cellulare (*Brachyspira*, geni codificanti tossine *E.coli*, geni codificanti tossine *Cl. perfringens*). Una eccezione a questo ragionamento sta nella metodica utilizzata a per il rilevamento del virus della PRRS. In IZSLER a livello di tutte le sezioni diagnostiche la metodica applicata per il rilevamento della PRRSV è una metodica che utilizza una miscela di 3 primer, quindi a rigor di logica una multiplex, ma in questa particolare reazione viene utilizzato un primer comune a EU e US e due primer uno specifico per i ceppi EU (distante 180bp dal primo) e l'altro primer specifico per ceppi US (distante dal primo 280bp). In questo modo è possibile rilevare la presenza di entrambi i genogruppi del virus anche se presenti contemporaneamente nel campione in analisi, non perdendo significativamente in sensibilità della reazione.

In ultima la PCR RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism, consiste in una PCR seguita da digestione del frammento ottenuto con un enzima di restrizione in grado di tagliare il frammento in presenza di determinate sequenze di DNA riconosciute dall'enzima di restrizione utilizzato. I polimorfismi in questi frammenti di restrizione permettono di tipizzazione del frammento di PCR ottenuto. Applicazioni di questa metodica di rilievo in patologia suina sono casi limitati e particolari come la tipizzazione batterica delle Clamidie, ed alcune tipizzazioni virali per scopi di ricerca (PRRSV, PCV2).

Ultima nata, nello spettro delle reazioni della polimerase, la Real Time PCR o PCR in tempo reale. Durante la Real time PCR il procedere della reazione e quindi la formazione di nuove copie del templatò è monitorato in tempo reale e non rilevato a fine reazione tramite elettroforesi su gel di agarosio. Tre sono le principali chimiche di reazione della Real Time PCR, Sybr green, Sonde a Idrolisi (Taqman®) e Sonde a Ibridazione (FRET). Senza entrare nei dettagli delle tre differenti applicazioni di queste chimiche di reazione, impiegate, comunque tutte permettono attraverso l'emissione di fluorescenza rilevabile da appositi strumenti, di monitorare la formazione di nuove molecole di templatò durante l'amplificazione (fig.4). Il vantaggio di questa tecnica è che questa possibilità di seguire la formazione di nuove molecole di DNA durante la reazione di PCR permette di rendere quantitativa la PCR. La Real Time PCR, infatti a differenza delle PCR tradizionali in cui la positività è rilevata al termine delle reazioni (end-point PCR) permette non soltanto di dire se un campione è positivo o negativo, per la presenza di DNA di questo o di quest'altro agente eziologico, ma permette anche di dire quante copie genomiche di quel agente sono contenute nel campione in analisi. La quantificazione tramite Real Time PCR può essere

1. Assoluta (per confronto con standard a concentrazione nota) o

2. Relativa (per confronto con un DNA differente dal target ma sempre presente)

La quantificazione relativa è una quantificazione che viene poco utilizzata in diagnostica delle malattie infettive, ma che permette ad esempio di rilevare la presenza di DNA OGM, in un mangime ad esempio, in quantità superiore alla soglia dell'1% ammissibile legalmente senza doverne dichiarare la presenza in etichetta. Questa soglia 1% di ingrediente OGM è determinata in confronto, *relativamente*, alla quantità di ingrediente non OGM contenuto.

In diagnostica delle malattie infettive del suino, viene utilizzata la quantificazione assoluta delle copie di DNA contenute del campione in analisi. Questa tipologia di quantificazione, prevede di costruire delle rette di regressione o di calibratura, con standard a concentrazione nota di DNA dell'agente eziologico in ricerca. Una volta costruita questa retta di regressione sarà possibile calcolare la concentrazione (numero di copie genomiche / ml) ignota dell'agente eziologico nel campione in analisi (fig.5).

Oltre a questa importante caratteristica, le Real Time PCR, presentano, elevata sensibilità sia analitica (ASe) che di norma è considerata equivalente ad una nPCR (10-100 volte più sensibile di una PCR tradizionale), minori problemi di inquinamento da prodotto amplificato evitando di dover evidenziare la presenza delle bande di amplificazione attraverso un gel di elettroforesi. A questi vantaggi, si oppongono problemi di inibizione della reazione da monitorare durante la reazione, che potrebbero risultare in taluni casi maggiori rispetto alle corrispondenti reazioni tradizionali e introducono un elemento di novità, la presenza di reazioni che necessitano di conferma ($ct > 36^\circ$ ciclo), che vengono di norma classificate come dubbi.

A parere dello scrivente, le Real Time PCR in diagnostica delle malattie infettive in campo suino, dovrebbe essere applicata, quando non posso farne a meno, cioè quanto mi interessa quantificare la presenza di un agente eziologico perché mi necessitano informazioni che soltanto attraverso la quantificazione posso ottenere. I casi riguardano il Circovirus suino tipo 2, PCV2, per una diagnosi molecolare di PMWS (Post Weaning Multisystemic Wasting Disease) ed il virus della sindrome respiratoria e riproduttiva suina (PRRSV) quando mi occorre la quantificazione della viremia, principalmente per scopi di ricerca o per pianificare interventi manageriali di esposizione programmata degli animali da rimonta al virus dell'allevamento. Un esempio di applicazione della quantificazione delle viremie osservabili in sieri suini conferiti per scopi analitici presso la sezione di Reggio Emilia IZSLER nel corso dell'anno 2006 e reperibile in (Bonilauri et. al 2007), dove in media furono osservate all'incirca 10^5 copie di virus per ml di siero, in 4 differenti allevamenti testati. Un aggiornamento di questo dato, prevede che ad oggi, in più di 150 campioni di siero analizzati con metodica Real Time PCR la viremia osservata è risultata compresa tra, un minimo di 10^3 copie cDNA / ml di siero, vicino al LOD del metodo, ed un massimo di 10^8 copie cDNA / ml siero. Ovviamente l'entità della viremia dipende dalla fase di viremia stessa dei soggetti campionati, dall'età degli animali e da numerosi altri fattori intrinseci ai singoli animali.

Discorso differente nell'infezione da PCV2 e nelle malattie ad esso collegate PMWN e PCVD, dove la carica virale presente nei soggetti malati è determinate ai fini di una diagnosi molecolare della malattia, in quanto la semplice presenza del virus (positività alla PCR tradizionale) non è ritenuta utile a fini diagnostici.

In letteratura, i lavori cui a cui ci si riferisce per una diagnosi molecolare di PMWS sono fondamentalmente due. Il primo di questi è Brumborg et al. (2004). In questo lavoro, gli autori descrivono i risultati ottenuti su 14 campioni di tessuti e siero di animali con PMWS provenienti da due allevamenti svedesi con segni clinici da PMWS, 20 linfonodi mesenterici di soggetti sani prelevati al macello e 80 sieri di animali sani provenienti dagli stessi 2 allevamenti dei soggetti con PMWS. L'entità della carica virale per PCV2 nei soggetti clinici con PMWS sia da siero che da tessuti è risultata in questo lavoro significativamente ($p < 0.05$) maggiore rispetto ai soggetti sani, ed il cut off proposto da questi autori è 10^6 - 10^7 copie virali per ml o per 500mg di tessuto, per distinguere i due gruppi di soggetti. Il secondo

lavoro di riferimento è stato presentato da Oliero et al. (2004), in questo contributo gli autori descrivono i risultati ottenuti su 87 sieri di soggetti conferiti all'istituto di patologia suina di Barcellona tra il 1997 e il 2002. I sieri di animali affetti PMWS sono stati suddivisi in tre categorie in base alla gravità delle lesioni macroscopiche e linfonodali osservate negli animali. Questi sono stati i gruppi analizzati in questo studio:

27 soggetti sono stati definiti a PMWS lievi, 24 soggetti con PMWS moderata, 24 soggetti con PMWS grave. Inoltre, sono stati inseriti in questo studio anche 12 soggetti con PDNS. Sia il gruppo dei soggetti con lesioni gravi che il gruppo dei soggetti con lesioni moderate hanno mostrato titoli virali significativamente maggiori dei soggetti con lesioni lievi e con PDNS. Il Cut off proposto da questi autori per la diagnosi molecolare di PMWS soltanto attraverso l'analisi della viremia sierica è 10^7 copie / ml di siero.

Per quel che riguarda l'applicazione di queste metodiche alla routine diagnostica praticata presso il laboratorio dell'autore di questa comunicazione, possiamo riferire i risultati di sieri di campo provenienti da 3 differenti allevamenti con sintomatologia clinica da PMWS. Nella medesima giornata sono stati prelevati campioni di siero in soggetti in 3 fasi della sintomatologia:

25 soggetti in fase preclinica (5 settimane di vita), 25 soggetti in fase clinica (8-9 settimane di vita) e 25 soggetti in fase post clinica (12-15 settimane di vita). Questi sono stati analizzati con Q-PCR secondo quanto riportato da Olvera et al. (2004). I soggetti in fase preclinica non avevano quantità rilevabili di virus nel siero, mentre i soggetti della fase clinica avevano un titolo significativamente ($p < 0.01$) maggiore (media log copie PCV2) / ml di siero = 6,77) rispetto ai soggetti della fase post clinica (media log copie PCV2) / ml di siero = 5,57).

In base alla nostra esperienza il cut-off molecolare per una diagnosi presuntiva di PMWS soltanto sulla base della Real Time QPCR è:

10^6 copie di virus / ml di siero

10^7 copie di virus / g di tessuto.

IL SEQUENZIAMENTO

Una tecnica molecolare che è divenuta di uso piuttosto comune anche in sanità suina, soprattutto per quel che concerne la gestione del virus della PRRS in allevamento è il sequenziamento di porzioni del genoma virale. La reazione di sequenziamento è una particolare reazione di PCR in cui oltre ai normali dNTP (deossi nucleotidi trifosfato) sono inseriti dei ddNTP di-deossi nucleotidi trifosfato, marcati con 4 fluorofori differenti. Una volta che durante la reazione di amplificazione uno di questi ddNTP marcati viene incorporato nella sequenza questo non potendo essere ulteriormente allungato impone lo stop alla reazione liberando l'enzima di sequenziamento. In questo modo, casualmente si formeranno frammenti di differenti dimensioni, da una base dopo il primer a circa 400, 500 basi dopo il primer. Questi frammenti possono essere separati tramite elettroforesi capillare o comunque su gel di acrilammide con risoluzione di una base e rilevati grazie alla marcatura fluorescente. Si sequenziano entrambi i filamenti, in due reazioni separate e la sequenza di questi è controllata in modo complementare. Il risultato di una reazione di sequenza è la sequenza dei 4 nucleotidi (A,C,G,T) che compongono il genoma virale e che consentono di predire la sequenza della proteina di cui contengono le informazioni, in base al codice genetico (Fig.6). Una volta ottenute più sequenze è possibile allinearle tra loro utilizzando software di allineamento appositamente sviluppati. Questi software confrontano le sequenze a due a due e costruiscono matrici di similarità genetica secondo specifici algoritmi. I più utilizzati sono contenuti nel software gratuito MEGA version 4 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007) che utilizza al suo interno il software CLUSTAL W per l'allineamento delle sequenze. Dalle matrici di similarità è possibile costruire alberi filogenetici sempre utilizzando tecniche statistiche applicate alla biologia molecolare e specifici algoritmi di calcolo, che consentono di disporre

sui medesimi bracci dell'albero le sequenze che risultano tra loro più simili (imparentate). Semplificando, gli alberi filogenetici rappresentano graficamente le relazioni di parentela tra le sequenze appaiate, più vicine le sequenze saranno nell'albero più imparentati saranno i ceppi. Gli alberi filogenetici si suddividono in due grandi raggruppamenti:

1. Radicati (rooted)
2. Non radicati (unrooted)

I primi sono alberi che si sviluppano a partire da un nodo centrale che rappresenta il più recente antenato comune delle sequenze che si trovano nell'albero. Questi tipi di alberi filogenetici dunque, sono in grado di fornire informazioni sia sulla correlazione genetica esistente tra gli organismi presenti sulle sue ramificazioni, sia sui rapporti evolutivi che intercorrono tra gli stessi. Ma si basano sull'assunzione che all'interno delle sequenze che si stanno raggruppando ci sia un antenato comune a tutte. Se questa assunzione non è supportata da evidenze forti, è meglio utilizzare gli alberi Non radicati. Dove ci si limita a fornire le relazioni genetiche che intercorrono tra le sequenze rappresentate, senza assumere relazioni di parentela evolutiva tra le stesse.

UTILIZZO E SIGNIFICATO DEL SEQUENZIAMENTO DEL VIRUS DELLA PRRS

Lo stato dell'arte nell'utilizzo del sequenziamento della PRRSV passa attraverso due incontri, ad opinione dello scrivente, fondamentali organizzati sull'argomento. Il primo di questi momenti, fu organizzato a Parma dal Prof. Martelli nell'ottobre 2005 ed era intitolato "PRRSv Fatti vs Speculazioni". In questo convegno intervenne il prof. Murtaugh dell'università del Minnesota. Durante il suo intervento il relatore espresse alcuni importanti fatti che richiamiamo qui. Quasi ogni isolato di PRRSV sarà diverso per quanto riguarda la sequenza delle basi da ogni altro stipite di virus. In alcuni casi queste differenze si riflettono su alcune caratteristiche del virus come la virulenza o sulla specificità immunitaria, in altri casi le mutazioni rimarranno silenti o non modificheranno le caratteristiche biologiche dei virus. In ogni caso, non ci sono ancora prove scientifiche definitive circa quale parte o quali parti determinano queste proprietà fenotipiche. Era allora, ed è tuttora, impossibile prevedere la relativa virulenza, immunogenicità e la specificità immunitaria dei ceppi solamente sulla base della loro sequenza, indipendentemente da quale porzione di virus (quale ORF) si prenda in considerazione. Inoltre mentre, due virus identici sono sempre omologhi, due virus differenti non sono sempre eterologhi, questa distinzione dipende dalla distanza nucleotidica (distanza evolutiva). Inoltre come detto sopra, i cambiamenti nella sequenza amminoacidica possono non aver effetto sulla struttura e sulla funzione della proteina (mutazioni fenotipicamente ininfluenti). Due ceppi sono eterologhi se non hanno un antenato comune recente. Purtroppo, però non è quasi mai possibile sapere la provenienza o i progenitori dei ceppi isolati in campo ed è quindi, necessario assumere che ceppi simili geneticamente siano imparentati tra loro. Sfortunatamente nessuno può stabilire con certezza un cut-off, oltre il quale si possa stabilire con certezza che due virus sono eterologhi. Il virus della PRRSV sembra mutare con un tasso massimo uguale a 0.5-1% all'anno (in media osservando lo stesso ORF). Partendo da queste osservazioni, ceppi simili al 95% potrebbero aver avuto un antenato comune non prima di 5-10 anni, per cui vengono comunemente considerati *eterologhi*. Però questa distanza non va considerata in modo assolutistico, se ad esempio un allevamento è stabile per PRRS i ceppi isolati saranno sempre molto simili tra di loro (98-100%). Se in un allevamento di questo tipo, incontriamo un ceppo simile al 96% (cioè differente per meno del 5%) questo è comunque molto più probabile che sia di nuova introduzione piuttosto che essersi evoluto da una popolazione virale preesistente, con tutto quello che una osservazione del genere può comportare. Per questo, risulta di fondamentale importanza archiviare più sequenze nel tempo nello stesso allevamento, in modo da poter monitorare l'introduzione di nuovi

ceppi in situazioni di stabilità, ed eventualmente rivedere alcune pratiche gestionali e di biosicurezza.

Infine, sono state recentemente descritte nuove sottovarianti virali del PRRSV in paesi dell'est europeo. Stadejek et. al. (2006) ha ipotizzato la possibilità di suddividere il genotipo europeo in 4 differenti sottotipi in base all'eccezionale variabilità osservata anche in lunghezza nel ORF7 del virus (Fig7), la porzione di genoma che contiene le informazioni genetiche per la nucleoproteina virale e che era considerata, a torto, la regione più stabile del genoma virale. Lettonia e Lituania sono due nuove nazioni della Comunità europea che hanno al loro interno una circolazione di ceppi di PRRS molto differenti da quelli circolanti in EU ovest. Questo potrebbe creare criticità sia di copertura vaccinale sia di capacità diagnostica dei test attualmente disponibili (soprattutto per quel che riguarda le PCR) di cui è bene tenere presente quando si dovessero osservare risultati di laboratorio inattesi e negativi, a fronte di lesioni evidenti a livello dei tessuti analizzati o dimostrazioni cliniche chiaramente riferibili alla circolazione del virus. In queste condizioni, tecniche di diagnostica diretta, più classiche come l'isolamento virale, dovrebbero essere prese in considerazione, in attesa di sviluppare nuove metodiche su base PCR in grado rilevare con sicurezza anche la presenza di queste nuove varianti del virus.

Bibliografia

K. Mullis. *Ballando nudi nel campo della mente*. Baldini Castaldi Dalai editore, Milano 2005.

O.I.E. manual for diagnostics test and vaccines for terrestrial animal. 2010. Chapter 1.1.4/5. Principles and methods of validazion of diagnostic assay for infectious diseases.

Bonilauri P., Merialdi G., Dottori M.. Rapida rilevazione e quantificazione della presenza di PRRSV genotipo EU tramite metodica Real Time RT-PCR. Possibili utilizzi e applicazione in campo. Atti del XXXIII convegno della Società di Patologia ed Allevamento dei Suini. Modena (MO) 29-30 Marzo 2007, 243-251

Brunborga I. M., T. Moldalb, C. M. Jonassen. (2004). Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using a TaqMan-based real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 122 (2004) 171–178.

Olvera A., M. Sibila, M. Calsamiglia, J. Segalés, M. Domingo. (2004). Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs. *Journal of Virological Methods* 117 (2004) 75–80.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).

Stadejek T., M.B. Oleksiewicz, D. Potapchuk, K. Podgórska. (2006) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *Journal of General Virology* (2006), 87, 1835-1841.

Fig.1

Termociclatore. Macchina in grado di modificare rapidamente la temperature delle provette contenenti le mix di reazione in essa posizionate, consentendo alla reazione di PCR espletarsi.



Fig.2

Rappresentazione grafica delle 3 temperature cardine di una reazione di PCR

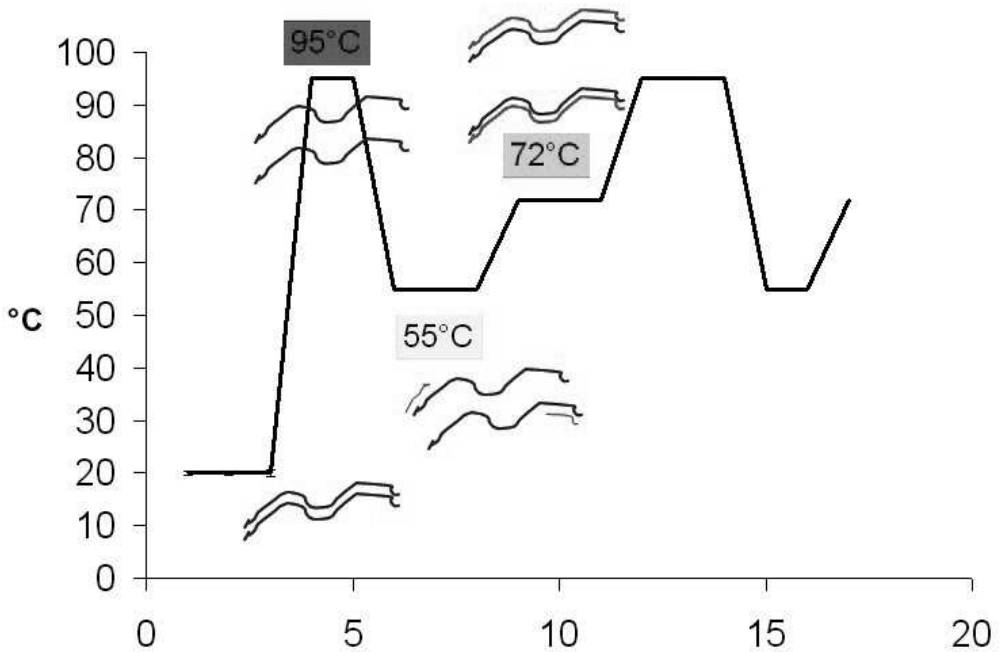


Fig.3

Immagine di gel di elettroforesi contenente campioni positivi per la presenza del virus della PRRS, di ceppo Europeo. Nella prima linea e nell'ultima è contenuto un marcatore di peso molecolare, che consente di stimare il peso della banda di amplificazione ottenuta nei campioni. La fluorescenza emessa dal marcatore intercalante permette di visualizzare il DNA amplificato.

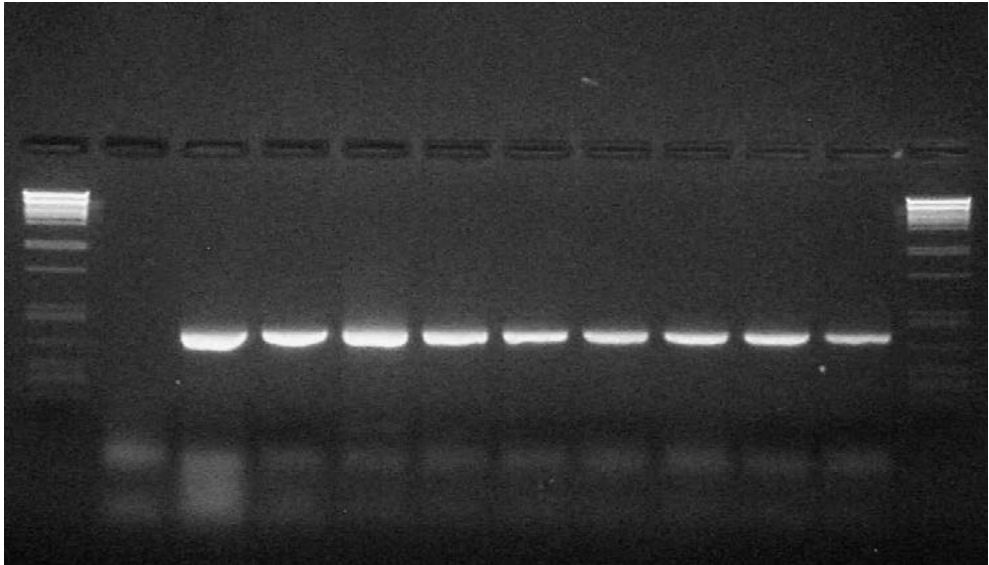


Fig.4

Risultato di una reazione di Real Time PCR. Il grafico rappresenta la misurazione della fluorescenza emessa da ogni campione durante l'amplificazione. La curva dall'andamento sinusoidale rappresenta una amplificazione positiva.

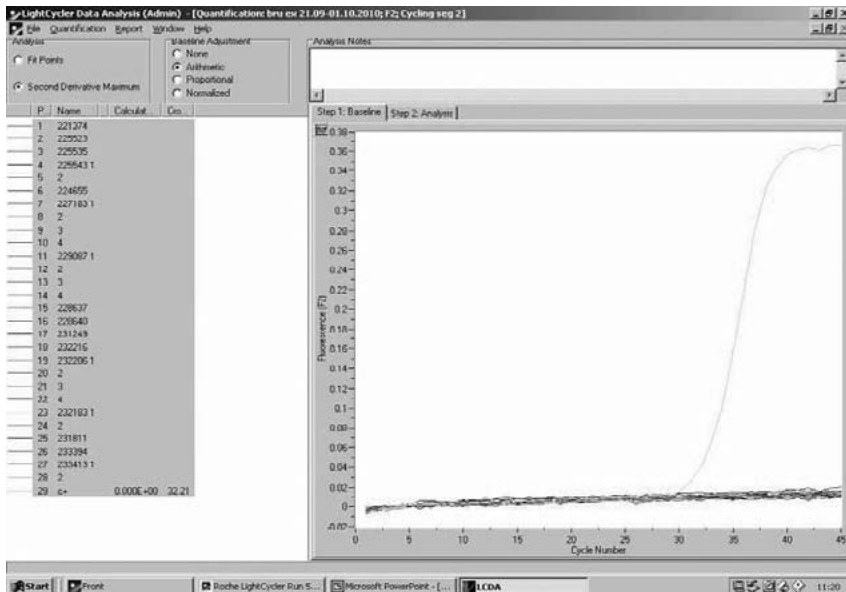


Fig.5

Risultato finale di una Real Time PCR di quantificazione assoluta. Nell'esempio, attraverso l'utilizzo di standard a concentrazione nota di DNA del target di reazione è possibile costruire rette di regressione che consentono di quantificare il DNA contenuto nei campioni a titolo ignoto.

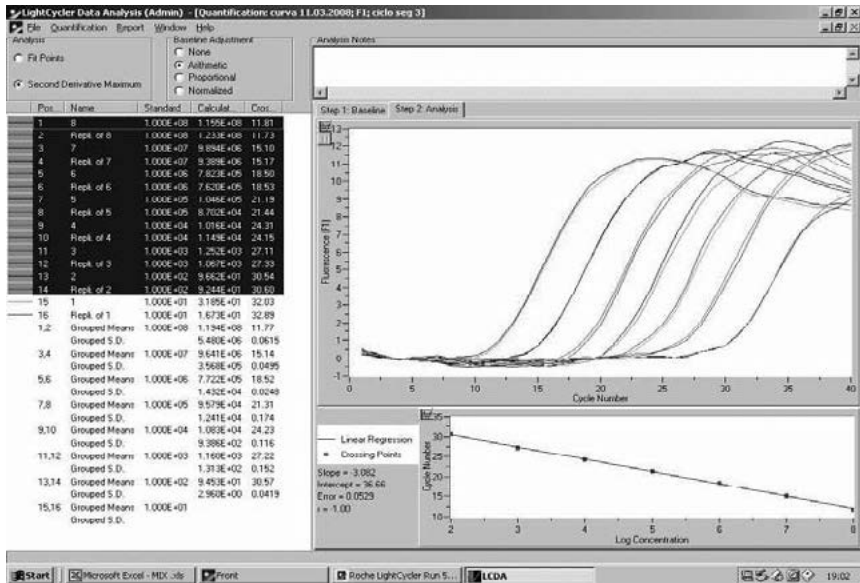


Fig.6

Allineamento di sequenza del ORF7 del PRRSV ottenuto attraverso l'utilizzo del software MEGA version 4 (Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007).

