

## COMUNICAZIONE 17

### APPLICAZIONE DI RT-PCR E METODICHE TRADIZIONALI NELLA RICERCA DI VIRUS INFLUENZALE DI TIPO A IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE IN ANATRE

E. FONI<sup>1</sup>, C. CHIAPPONI<sup>1</sup>, D. LORI<sup>1</sup>, M.A. DE MARCO<sup>2</sup>, M. DELOGU<sup>3</sup>, E. RAFFINI<sup>4</sup>, P. MASSI<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Parma, Italy - <sup>2</sup>Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica "A. Ghigi-Ozzano E. (BO), Italy - <sup>3</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria - Bologna, Italy - <sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Lugo, Italy - <sup>5</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" - Forlì

Parole chiave: Influenza aviaria, RT-PCR, Infezione Sperimentale, *Anas platyrhynchos*

#### Application of RT-PCR and standard methods in influenza A virus detection in experimental infection of ducks

Key words: Avian influenza, RT-PCR, experimental infection, *Anas platyrhynchos*

Summary : RT-PCR for detection of influenza A virus using set of primers based on conserved regions of the matrix gene and of the nucleoprotein gene is tested in comparison to embryonated chicken eggs and to three established cell lines (MDCK, NSK, NPTr) in cloacal swabs examination during experimental infection of *Anas Platyrhynchos* with H7N1 avian strain.

Correspondence: Emanuela Foni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna "B. Ubertini" Sezione di Parma, Via dei Mercati 13/A 43100 Parma, e-mail: [emanuela.foni@bs.izs.it](mailto:emanuela.foni@bs.izs.it)

#### Introduzione

L'influenza aviaria si è recentemente manifestata in Italia con due epidemie tra gli anni 1997 e 2000. La prima, sostenuta da un virus influenzale ad elevata virulenza (HPAI) appartenente al sottotipo H5N2, la seconda epidemia, sostenuta da virus H7N1, ha duramente colpito il patrimonio avicolo nazionale (1). La costante circolazione di virus influenzale è stata inoltre dimostrata in anatidi selvatici svernanti in Italia, a ribadire l'importanza di queste specie nella perpetuazione del virus influenzale in natura (4). Va ricordato inoltre che i virus influenzali suini circolanti in Italia e in Europa derivano dal riassortimento genetico tra virus aviari ed umani (2). Non va inoltre sottovalutata la possibilità di trasmissione di ceppi aviari alla specie umana come recentemente avvenuto in Hong Kong (3). Considerati i poliedrici aspetti epidemiologici, viene a rivestire particolare importanza la tempestività della diagnosi di influenza e quindi la disponibilità di uno strumento di rapida conferma del sospetto di infezione. In tal senso l'applicazione di RT-PCR nella ricerca di virus influenzali ha fornito esiti confortanti (7). In questo studio si è voluto confrontare l'utilizzo di metodiche diagnostiche diverse nella dimostrazione di virus influenzale da tamponi cloacali prelevati nel corso di una prova di infezione sperimentale di anatre germanate con virus influenzale H7N1 a bassa patogenicità isolato dal tacchino. La valutazione comparativa ha previsto l'inoculazione di uova embrionale (UE), ritenuta il "gold standard", l'infezione di tre linee cellulari e l'applicazione di RT-PCR alla amplificazione di regioni geniche della matrice (M) e della nucleoproteina (NP) dei virus influenzali di tipo A.

#### Materiali e metodi

**Campioni.** La prova di infezione sperimentale è stata realizzata utilizzando 8 anatre germanate (*Anas platyrhynchos* forma domestica) di 50 giorni di età, schiuse ed allevate in condizioni di biosicurezza, virologicamente e sierologicamente negative per influenza. Le anatre sono state infettate per via orale con il virus influenzale a bassa patogenicità A/turkey/Italy/5563/99 H7N1, utilizzando 0,5 ml di liquido allantoideo, diluito in PBS, contenente 10<sup>6</sup> EID<sub>50</sub>. Prelievi di tamponi cloacali sono stati eseguiti giornalmente per i primi 5 giorni dopo l'infezione (PID)

e successivamente a 8, 11, 14, 17, 21, 28, 35, 42, 49 PID. A 49 PID i soggetti hanno subito una reinfezione con le stesse modalità e tamponi cloacali sono stati prelevati a 50, 51, 52, 53, 57, 64, 72 PID. In totale sono stati raccolti 168 tamponi cloacali che sono stati conservati in tampone glicerinato a -80° C fino al momento dell'inizio delle prove.

**Isolamento virale.** Inoculazione di UE per tre passaggi seriali consecutivi è stata eseguita secondo metodiche in uso nel laboratorio (8). Sono state inoltre inoculate tre linee cellulari diverse: due di origine suina, NSK (Newborn Swine Kidney) e NPTr (Newborn Pig Trachea) (5) e una di origine canina, MDCK, che rappresenta il substrato standard per l'isolamento del virus influenzale, secondo metodiche già descritte (6). Si è proceduto a tre passaggi seriali. Ad ogni passaggio liquidi allantoidei e sovranatanti cellulari sono stati esaminati per presenza di attività emoagglutinante (HA) (8). I campioni risultati positivi sono stati esaminati tramite inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando siero iperimmune omologo (8).

**RT-PCR.** L'RNA virale è stato estratto dai tamponi cloacali (7). Dopo retrotrascrizione, un'aliquota di cDNA è stata utilizzata per la reazione di PCR. La ricerca del genoma virale ha previsto l'utilizzo dei primers M52C e M253R (7), in grado di amplificare una regione codificante la matrice dei virus influenzali di tipo A. Come conferma della specificità della reazione i campioni positivi sono stati ulteriormente testati con i primers A/NP/8/1 e A/NP/522/2 per ricercare la presenza del gene codificante per la NP.

#### Risultati

Nella tabella 1 sono riportati i dati relativi alla dimostrazione di virus influenzale effettuata utilizzando i diversi substrati e tramite applicazione di RT-PCR. Sono risultati positivi 36 campioni con tecnica RT-PCR, 27 campioni con la tecnica di inoculazione di UE mentre utilizzando il sistema delle colture cellulari si sono registrati 18 casi di positività. Dalla valutazione dei dati si evidenzia come la tecnica di inoculazione di UE detenga ancora la più elevata percentuale di isolamento (16%), a confronto con l'utilizzo contemporaneo di 3 linee cellulari (10,7%). Il paragone fra le linee cellulari, NSK, NPTr, MDCK fa rilevare una

più alta percentuale di isolamenti utilizzando la linea NPTr. Di interesse il dato riguardo alla percentuale di positività dei campioni esaminati tramite RT-PCR (21,4%).

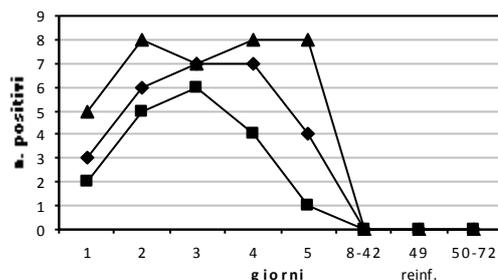
Nella tabella 2 vengono riportati i dati relativi alla valutazione della sensibilità e specificità dei test posti a confronto designando come "gold standard" la tecnica di inoculazione di UE. Si osserva come, utilizzando RT-PCR, si è rilevata positività per presenza di virus influenzale in 9 campioni risultati invece negativi alla prova di inoculazione di UE. Si riscontra invece un valore di ridotta sensibilità (66%) per le colture cellulari, a confronto con l'inoculazione delle uova. Dall'esame del grafico riportato in figura 1 si evince come non sia stato possibile evidenziare la presenza del virus influenzale oltre 8 PID, anche dopo la reinfezione. Confrontando l'andamento delle curve che rappresentano il numero di rilevazioni virali nel tempo si osserva che, da 1 a 5 PID, la RT-PCR ha evidenziato la presenza del virus in 1-2 campioni in più, per ogni giorno di prelievo, mentre dal 5 al 8 PID, con questa metodica, è raddoppiato il numero di rilevazioni virali rispetto all'isolamento in UE.

**Tabella 2:** Confronto fra i test considerando l'isolamento su uova embrionate come "gold standard"  
**Table 2:** Comparison of diagnostic tests taking embryonated chicken eggs as reference

test1/ test2	+/+	+/-	-/+	-/-	Sensibilità relativa%	Specificità relativa%
PCR/ Uova	27	9	0	132	100	94
Cellule/ Uova	18	0	9	141	66	100

**Figura 1:** Andamento dei rilevamenti virali tramite diverse tecniche diagnostiche. ▲ positivi in RT-PCR, ◇ isolamenti su UE, ■ isolamenti su cellule

**Figure 1:** Graph of virus detection using various diagnostic methods. ▲ RT-PCR positives, ◇ UE isolates, ■ cell line isolates



## Discussione

L'applicazione di RT-PCR ha permesso di aumentare la percentuale di campioni positivi da 16%, ottenuta utilizzando l'inoculazione di UE, a 21,4%; il numero di campioni positivi in RT-PCR rispetto alla inoculazione di UE è stato maggiore nei campioni prelevati da 5 a 8

**Tabella 1:** Utilizzo di metodiche diverse per la ricerca di virus influenzale da 168 tamponi cloacali di anatre infettate sperimentalmente

**Table 1:** Detection of influenza virus in 168 cloacal swabs from experimentally infected ducks by various methods

Metodo	RT-PCR	Uova embrionate				NSK,NPTr,MDCK				NSK				NPTr				MDCK			
		I *	II	III	tot	I	II	III	tot	I	II	III	tot	I	II	III	tot	I	II	III	tot
campioni positivi	36	23	4	0	27	11	6	1	18	8	3	2	13	6	8	0	14	5	3	1	9
% di positività	21.4	13.6	2.4	/	16	6.5	3.6	0.6	10.7	1.2	3.4	4.8	/	3.4	4.8	/	8.2	2.8	1.8	0.6	5.2

\* passaggio seriale

PID, periodo nel quale l'eliminazione virale stava diminuendo.

Come ulteriore indagine sulla sensibilità della reazione RT-PCR va riportato che è stato possibile rilevare la positività di un campione anche quando esso è stato diluito 6 volte in campione negativo confermando la possibilità di utilizzare questa metodica anche nello screening di pool di campioni. Non di secondaria importanza è l'aspetto della rapidità con cui si può allestire ed eseguire la prova, riducendo ad 8 ore i tempi di risposta in caso di sospetto di infezione influenzale. L'applicazione delle colture cellulari si conferma di scarso supporto nella diagnostica dell'influenza, a parte il vantaggio di non dover ricorrere all'utilizzo di modelli animali, la percentuale di positività con questa metodica rimane ancora troppo bassa, anche utilizzando tre linee cellulari diverse. Fra queste la linea cellulare suina NPTr ha dimostrato di rilevare la più alta percentuale di positività.

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la Dr.ssa Francesca Paganelli, il Sig. Angelo Biondi e la Sig. Roberta Manfredi per la preziosa collaborazione tecnica. Si ringrazia il Dr. R.G. Webster per aver fornito le sequenze dei primer del gene della nucleoproteina.

## Bibliografia

1. Capua I. and Marangon S. (2000) The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. Avian Pathol 29, 289-294.
2. Castrucci M.R., Donatelli I., Sidoli L., Barigazzi G., Kawaoaka Y. And Webster R.G. (1993) Genetic reassortment between avian and human influenza A virus in Italian pigs. Virology 193, 503-506.
3. Claas E.C., Osterhaus A.D., Van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F. and Webster R.G.(1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. Lancet, 351, 472-477.
4. De Marco M.A., Foni E., Campitelli L., Raffini E., Di Trani L., Delogu M., Guberti V., Barigazzi G., and Donatelli I. (2002) Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-1999 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. Fifth International Symposium on Avian Influenza. Athens, Georgia April 14-17, 2002, in press.
5. Ferrari M. et al. (2002) Establishment of new pig cell lines to be used in virological diagnosis field. J Virol. Methods, in press.
6. Foni E., Ferrari M., De Marco M.A., Donatelli I., Barigazzi G. (2000) Use of the NSK cell line in swine and avian species. Proceedings of the 5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology. Brescia, Italy 27-30 August 2000, 311.
7. Fouchier Ron A.M., Bestebroer S.H., Van de Kemp L., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D. (2000) Detection of Influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J of Clinical Microbiology Nov 2000, 4096-4101.
8. Kendall A.P., Pereira M.S., Skehel J.J. (1982) "Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance". Atlanta, U.S. Department of Health and human Service.