

## UTILIZZO DI *REVERSE GENETICS* PER LA MESSA A PUNTO DI UN CONTROLLO POSITIVO PER LA RILEVAZIONE E DISTINZIONE, MEDIANTE RT NESTED PCR, DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A E B.

M. Falchieri<sup>1</sup>, P. A. Brown<sup>1</sup>, E. Catelli<sup>2\*</sup> and C. J Naylor<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE, Neston, United Kingdom*

<sup>2</sup> *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

\**Corresponding author* Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italy – Tel. +39 051 2097080- Fax: +39 051 2097039 – [Email elena.catelli@unibo.it](mailto:elena.catelli@unibo.it)

Un protocollo standard di RT Nested-PCR ad alta sensibilità viene comunemente usato nei nostri laboratori per evidenziare *Metapneumovirus* aviare (AMPV) e distinguere i sottotipi A e B (Cavanagh et al., 1999). Tale protocollo prevede, a seguito della fase di retrotrascrizione (RT), due PCR consecutive localizzate a livello del gene che codifica per la proteina di adesione (G). La prima amplificazione, cosiddetta esterna, utilizza *primer* (G1 + e G6 -) comuni a entrambi i sottotipi, mentre la seconda PCR, o interna, prevede un *primer* antisenso comune (G5 -) e due *primer* senso, uno specifico per il sottotipo A (G8+A) e l'altro specifico per il sottotipo B (G9+B). In caso di positività al sottotipo A l'amplificato è di 268 pb mentre al sottotipo B è di 361 pb. Fino ad oggi si è sempre evitato l'impiego di virus come controlli positivi per il rischio di possibili contaminazioni responsabili di falsi positivi.

Questo lavoro descrive l'utilizzo di metodiche di *Reverse Genetics* per la produzione di un virus geneticamente modificato in grado di generare nella RT Nested PCR standard precedentemente descritta, amplificati di dimensioni maggiori rispetto a quelli generati da virus non modificati. Tale virus, impiegato come controllo positivo, rende possibile evidenziare immediatamente eventuali contaminazioni.

Una copia DNA del genoma di un AMPV sottotipo A è stata modificata tramite *Site Direct Mutagenesis* al fine di introdurre, a livello del gene G, la sequenza nucleotidica del primer specifico per il sottotipo B (G9+B), nella posizione equivalente. Per aumentare le dimensioni degli amplificati è stata successivamente introdotta una sequenza esogena fra i siti di attacco delle coppie di *primer* esterne ed interne della PCR. Il prodotto finale della PCR da DNA modificato ha prodotto amplificati di 463 e 556 pb, per il sottotipo A e B rispettivamente, di dimensioni maggiori rispetto a quelle che si ottengono da virus non modificati (figura 1). Mediante *Reverse Genetics* (Naylor et al., 2004), è stato quindi generato, da DNA modificato, un virus che dopo estrazione dell'RNA ed RT Nested PCR ha prodotto ugualmente gli amplificati attesi. Successivamente, per convenienza, il virus è stato adsorbito su carta filtro, fatto asciugare e inattivato tramite trattamento con microonde, quindi conservato in provette. L'RNA estratto da tali preparati è stato quindi usato efficacemente come controllo positivo.

## Bibliografia

Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.

Naylor C.J., Brown P.A, Edworthy N., Ling R., Jones R.C., Savage C.E., Easton A.J. (2004). Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology*, 85: 3219-3227.

**Figura 1.** Elettroforesi in gel di agarosio di amplificati da RT Nested PCR per AMPV sottotipo A e B. DNA Marker (linee 1 e 5); prodotto da controllo positivo AMPV geneticamente modificato (linea 2: amplificati di 556 e 463 pb); prodotti da virus non modificati: sottotipo B (linea 3: amplificato di 361 pb) e sottotipo A (linea 4: amplificato di 268 pb).

