

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. Falchieri¹, P. A. Brown¹, E. Catelli^{2*} and C. J Naylor¹.

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

² *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).

