

## **MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DI REAL TIME PCR PER LA DIAGNOSI E LA QUANTIFICAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A E B**

Cecchinato M.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Munoz Pogoreltseva O.S.<sup>2</sup>, Listorti V.<sup>2</sup>, Mondin A.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Agripolis - Viale dell'Università, 16 ; 35020 Legnaro (PD), Italia*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 40064 Ozzano Emilia (BO) – Italia*

### **Summary**

Direct diagnosis of avian Metapneumovirus (AMPV) infections rely on molecular techniques more than on virus isolation due to the fastidious nature of the virus. Six real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) protocols for the detection and differentiation of AMPV subtype A and B were developed in N (two tests), F, SH (two tests) and G genes. In five assays SYBR Green I was used as detection system, and in one, molecular beacon probes. Specificity was evaluated using various AMPV strains and other avian respiratory viruses such as Newcastle disease virus, Infectious laryngotracheitis virus and Infectious bronchitis viruses. All tests were able to detect AMPVs and failed to detect non-AMPV viruses, and five out of six of them were also able to discriminate between AMPV A and B subtypes. Sensitivity was determined using serial dilutions of RNA extracted from AMPV of both subtypes. The best results in terms of specificity and sensitivity were given by the qRT-PCR protocol developed using a set of primers designed in the SH gene.

### **INTRODUZIONE**

Il Metapneumovirus aviare (AMPV) è un virus RNA a singolo filamento non segmentato a polarità negativa. Finora sono stati identificati quattro sottotipi di questo virus, A, B, C e D (Gough e Jones, 2008). I primi due sono quelli maggiormente diffusi a livello mondiale e sono gli unici ad essere stati segnalati nel territorio italiano. Il sottotipo B è quello maggiormente diffuso in Italia (Cecchinato *et al.*, 2010), soprattutto nelle zone del Nord, dove vi è una maggiore concentrazione di allevamenti avicoli.

Il virus colpisce diverse specie aviari, particolarmente tacchino e pollo. Nel tacchino causa un'infezione acuta e molto contagiosa del tratto respiratorio superiore, la Rinotracheite del tacchino (TRT). Mentre nel pollo causa una malattia clinica meno evidente e meno grave, sempre che non sia complicata da altri fattori, soprattutto batterici come *Escherichia coli* (Gough e Jones, 2008). In questi casi sfocia spesso nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Può causare perdite economiche significative, legate principalmente alle infezioni batteriche secondarie (OIE, 2012a). Sia nel tacchino che nel pollo è in grado anche di provocare cali della ovodeposizione (Naylor e Jones, 1993; Cecchinato *et al.*, 2012).

La variabilità genomica di AMPV insieme con le manifestazioni cliniche non patognomoniche riportate nelle diverse specie aviari, la sua scarsa capacità di replicazione nell'organismo ospite e la sua capacità di causare infezioni in assenza

di sintomatologia clinica evidente (Cook *et al.*, 1988), rendono necessari metodi diagnostici molto sensibili, accurati e affidabili (Cook e Cavanagh, 2002). La biologia molecolare offre un'alternativa veloce, sensibile, pratica e specifica per la diagnosi delle infezioni sostenute da AMPV (OIE, 2009) rispetto alle metodiche classiche. Per questa ragione nel corso degli anni sono stati messi a punto diversi protocolli di RT-PCR per la ricerca di questo virus e negli ultimi anni è stata rivolta particolare attenzione all'applicazione di una variante della PCR convenzionale, la Real-Time PCR. La Real-Time PCR è una tecnica che permette di osservare la cinetica della formazione degli amplificati in tempo reale grazie all'uso di sostanze fluorescenti che si legano, in forma specifica o aspecifica, alla sequenza bersaglio e successivamente emettono un segnale fluorescente che aumenta di intensità con l'aumentare del numero di amplificati sintetizzati. Permette simultaneamente di identificare e quantificare la sequenza bersaglio e non richiede ulteriori passaggi per la visualizzazione dell'amplificato come invece avviene nella PCR, riducendo così i tempi di diagnosi e limitando la manipolazione del campione (Watzinger *et al.*, 2006).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di mettere a punto una Real-Time PCR capace di identificare, discriminare e quantificare AMPV sottotipo A e B.

Nella prima fase è stato utilizzato un sistema di quantificazione aspecifico. Sono state testate varie coppie di primer, disegnate sulle sequenze di geni diversi, e scelta la migliore in termini di sensibilità e specificità. Nelle fasi successive il sistema di quantificazione è stato sostituito con sonde sottotipo specifiche. Il protocollo è stato successivamente ottimizzato e messo a confronto con il protocollo di RT nested-PCR per AMPV, attualmente più usato sia in Italia che all'estero, disegnato da Naylor *et al.* (1997), testando ceppi virali a titolo noto e campioni da prove sperimentali.

## **MATERIALI E METODI**

### *SYBR® Green I qRT- PCR*

In base a criteri di carattere economico e pratico si è scelto in via preliminare di mettere a punto la qRT-PCR con l'uso di SYBR® Green I. Le sequenze dei geni che codificano per la nucleoproteina (N), la glicoproteina di superficie (G), la proteina di fusione (F) e la *small hydrophobic protein* (SH) di AMPV sottotipo A e B, presenti in GenBank o derivanti da precedenti studi di sequenziamento (Catelli *et al.*, 2006; Cecchinato *et al.*, 2010), sono state usate per disegnare una coppia di primer per ciascuno di questi geni. Tutti i primer sono stati progettati con l'uso del software Beacon Designer 7.0. Inoltre sono stati usati anche i primer disegnati da Bâyon-Auboyer *et al.* (1999) diretti verso il gene N.

Tutte le coppie di primer sono state testate per la loro capacità di identificare e differenziare AMPV A e B mediante analisi delle curve di dissociazione ottenute dagli amplificati di ceppi noti di AMPV.

Infine utilizzando i Cp ottenuti da diluizioni seriali di RNA estratto da un ceppo di AMPV sottotipo B (IT/Ty/B/Vr240/87) è stato possibile creare una curva standard da cui è stata calcolata l'efficienza e l'errore della reazione per ogni coppia di primer.

## *Molecular Beacon one-Step qRT-PCR*

In base ai risultati ottenuti con le prove eseguite usando SYBR® Green I come chimica fluorescente, si è deciso di continuare le prove con la coppia di primer diretti verso la sequenza del gene SH e si è optato di cambiare chimica fluorescente e di disegnare e utilizzare due sonde Molecular Beacon sottotipo specifiche. Ciascuna sonda è stata marcata con un fluorocromo diverso, così da potere differenziare i due sottotipi grazie alle diverse lunghezze d'onda emesse dai fluorocromi.

Questo nuovo protocollo è stato testato in termini di:

- specificità: sottoponendo a qRT-PCR 15 ceppi di AMPV e altri microrganismi responsabili di infezione respiratoria nel pollame;
- limite inferiore di sensibilità (OIE, 2012b): è stato calcolato utilizzando diluizioni seriali in base 10 di sospensioni virali a titolo noto di AMPV-A (ceppo IT/Ty/A/259-01/06) e AMPV-B (ceppo IT/Ty/B/Vr240/87). Ciascun ceppo virale è stato suddiviso in due aliquote. Ciascuna aliquota è stata sottoposta da parte di due operatori a diluizioni scalari in base 10, in triplicato. L'RNA è stato estratto da ciascun replicato e usato come template per due qRT-PCR eseguite da due operatori diversi così da ottenere 12 replicati per ciascuna diluizione.
- linearità, errore ed efficienza: i Cp ottenuti dai 12 replicati descritti nel paragrafo precedente, sono stati utilizzati per creare una curva standard per ciascun virus da cui poi sono stati calcolati tali parametri.

Infine è stato eseguito un paragone tra la qRT-PCR messa a punto in tale studio e la RT nested-PCR descritta da Naylor *et al.* (1997), uno dei protocolli diagnostici maggiormente utilizzati per l'identificazione e la tipizzazione di AMPV sottotipo A e B. Per tale confronto sono stati utilizzate diluizioni scalari in base 10 di RNA estratto da AMPV-A (ceppo IT/Ty/A/259-01/06) e AMPV-B (ceppo IT/Ty/B/Vr240/87) e campioni ottenuti da soggetti inoculati sperimentalmente con AMPV-A (ceppo LTZ) e AMPV-B (ceppo IT/Ty/B/Vr240/87).

## **RISULTATI**

### *SYBR® Green I RRT-PCR*

Tutte le coppie di primer disegnate nel presente lavoro sono state in grado di amplificare i ceppi di AMPV analizzati con valori di Cp che oscillavano da 17,65 a 35. I Cp più bassi sono stati registrati con i primer disegnati in questo studio sul gene N (Cp 23,37) quando è stato utilizzato come *template* AMPV-A. La qRT-PCR che prevedeva l'utilizzo dei primer in SH è risultata la più sensibile per AMPV-B (Cp 17,65). La coppia di primer disegnata in F ha prodotto Cp più elevati utilizzando come *template* entrambi i ceppi di AMPV (AMPV-A Cp 35; AMPV-B 25,45).

Per valutare la capacità dei primer di discriminare fra i sottotipi A e B, sono state considerate le differenze fra le temperature di *melting* (Tm) dei diversi ceppi. È stata considerata discriminante una differenza di circa 1°C. Scartata la coppia di primer in G per la sua incapacità di produrre delle Tm univoche, fra gli altri primer, tutti, tranne la coppia di primer disegnati in N, hanno prodotto delle Tm ben distinte fra i sottotipi considerati. La coppia di primer in F è stata quella che ha prodotto delle Tm più diverse fra i sottotipi (differenza di 1,88 °C), mentre quella in N ha originato Tm

non soltanto molto simili fra i sottotipi (AMPV A 78,29; AMPV B 78,12), ma anche molto vicine alla Tm del controllo negativo (78,25).

I primer disegnati in SH hanno prodotto la reazione con indice di errore più basso (0,00217) ed i primer in N la migliore efficienza (2,006), giacché più vicina a 2. Nonostante questo, la maggiore linearità della reazione è stata ottenuta con i primer in SH probabilmente grazie al loro indice di errore più basso. Inoltre questi primer sono risultati quelli più sensibili, dando i valori di Cp più bassi.

Analizzando però le Tm prodotte con tali primer, è stato possibile osservare come queste erano specifiche ed univoche fino a diluizioni  $10^{-3}$  dell'RNA virale mentre a diluizioni maggiori comparivano due picchi, di cui uno molto vicino alla Tm del controllo negativo.

La mancanza di specificità a basse concentrazioni ha reso questo protocollo poco adatto per la quantificazione virale, motivo per il quale si è deciso di continuare la messa a punto del protocollo con l'utilizzo dei primer disegnati in SH e di sostituire la chimica fluorescente SYBR® Green I con l'utilizzo di sonde, sistema di quantificazione più specifico.

#### Molecular Beacon one-Step qRT-PCR

- Specificità: tutti i ceppi AMPV sia A che B testati sono stati amplificati dando dei Cp che oscillavano fra 14,39 e 24,13. Non sono invece stati amplificati gli altri virus testati.

- Limite inferiore di sensibilità: il limite inferiore di sensibilità rilevato è stato di  $10^{-0,41} ID_{50}/ml$  per AMPV-B IT/Ty/B/Vr240/87 e  $10^{1,15} ID_{50}/ml$  quanto testato il ceppo AMPV-A IT/Ty/A/259-01/03.

- linearità, errore ed efficienza: i risultati sono riportati in Tab. 1.

**Tab. 1** Efficienza, errore e linearità della qRT-PCR messa a punto in questo studio.

		Efficienza	Errore	R <sup>2</sup>
Virus	IT/Ty/A/259-01/03	2,043	0,193	0,9375
	IT/Ty/B/Vr240/87	1,842	0,132	0,957

La qRT-PCR con l'utilizzo di sonde, messa a confronto con la RT nested-PCR descritta da Naylor *et al.* (1997), è risultata 1.000 volte più sensibile nel rilevare l'RNA estratto da AMPV-B e 10.000 nel rilevare l'A.

Il confronto dei risultati ottenuti utilizzando campioni di AMPV sottotipo A e B ottenuti da due diverse prove di inoculazione sperimentale, ha confermato i risultati dalle prove di sensibilità utilizzando diluizioni seriali di RNA, cioè la maggiore sensibilità del protocollo di qRT-PCR rispetto alla RT nested-PCR. Sul totale dei 50 campioni esaminati durante la prova sperimentale di inoculazione del ceppo AMPV-A, la RT nested-PCR ha identificato come positivo soltanto un campione. Al contrario, la qRT-PCR ne ha identificati come positivi 45 su 50. La sensibilità

della RT nested-PCR non è migliorata quando si sono testati i campioni sperimentali di AMPV sottotipo B. Su un totale di 32 campioni la RT nested-PCR è riuscita ad identificare l'RNA virale in 5 campioni mentre la qRT-PCR ne ha identificati 31 su 32.

## DISCUSSIONE

Nel presente studio è stato messo a punto un protocollo di qRT-PCR in grado di identificare, discriminare e quantificare AMPV sottotipo A e B.

Inizialmente è stato scelto come metodo di quantificazione una chimica fluorescente, pratica e relativamente economica, SYBR® Green I, ed è stata valutata quale coppia di primer fosse più sensibile e specifica. Sono state disegnate e testate quattro coppie di primer rispettivamente sulla sequenza dei geni F, SH, G ed N assieme ad una coppia di primer disegnata in N da Bâyon-Auboyer *et al.* (1999).

Alla fine dei primi test si è giunti alla conclusione che i primer più sensibili, specifici e capaci di dare la curva standard più lineare erano quelli basati sulla sequenze del gene SH, nonostante ci si potesse aspettare che i primer più sensibili sarebbero stati quelli basati sulla sequenza del gene N. Infatti esistono studi che indicano che, nei virus ad RNA a singolo filamento non segmentato a polarità negativa, i geni più vicini all'estremità 3' sono trascritti più abbondantemente rispetto agli altri (Barik, 1992). Questa caratteristica è tipica dei virus appartenenti all'ordine dei *Mononegavirales* e il gene N è proprio il gene più vicino all'estremità 3' negli AMPV. Infatti la qRT-PCR per la diagnosi di AMPV, basata sul gene G, testata da Guionie *et al.* (2007), ha mostrato una minore sensibilità rispetto ad una qRT-PCR disegnata sul gene N per la diagnosi del Metapneumovirus umano (Maertzdorf *et al.*, 2004).

Il protocollo in SH è stato in grado di discriminare fra sottotipo A e B, perché ha dato origine a Tm specifiche per ogni sottotipo. Tuttavia a basse concentrazioni di RNA virale, le Tm non erano univoche e ciò ha reso il protocollo non affidabile per prove di quantificazione.

Bisogna comunque sottolineare che, anche se il protocollo di qRT-PCR con SYBR®Green I non ha permesso la quantificazione affidabile dell'RNA virale, esso potrebbe comunque essere usato come metodo diagnostico grazie alla sua specificità, economicità ed indipendenza da eventuali mutazioni genomiche presenti nell'amplificato.

Poiché l'obiettivo dello studio era anche mettere a punto un protocollo in grado di quantificare l'RNA virale, si è deciso di sostituire il sistema di quantificazione. Di conseguenza sono state disegnate sonde Molecular Beacon sottotipo A e B specifiche. Queste sonde, se ben disegnate, sono capaci di distinguere anche un singolo *mismatch* in forma più accurata di qualsiasi altra sonda (Tyagi *et al.*, 1998); il che le rende molto specifiche però anche molto dipendenti dalla costanza nel tempo della sequenza che hanno come bersaglio.

Nonostante ciò il test disegnato in SH si è dimostrato capace di identificare e discriminare diversi ceppi di AMPV-B isolati in un arco di tempo che va dal 1987 al 2010. Ciò indica che le variazioni genetiche avvenute in queste ultime due decadi non sono state tali da inficiare la capacità dei primer e della sonda scelti di identificare i ceppi di sottotipo B italiani. La tendenza alla mutazione del gene SH rende necessario avere a disposizione informazioni relative alla evoluzione dei ceppi di campo nel tempo per non incorrere in campioni diagnostici falsi negativi.

Questo nuovo protocollo di qRT-PCR basato sul gene SH è stato confrontato con la

RT nested-PCR disegnata sul gene G da Naylor *et al.* (1997). Questo ha permesso di dimostrare una sensibilità molto maggiore della qRT-PCR nel mettere in evidenza sia diluizioni di RNA di ceppi virali a titolo noto sia campioni ottenuti da prove sperimentali. Tali dati sono in contrasto con i risultati ottenuti da Ferreira *et al.* (2009), che hanno riscontrato medesima sensibilità fra qRT-PCR e RT nested-PCR confrontati.

Le curve standard generate utilizzando come campioni diluizioni seriali di ceppi di AMPV-A e -B a titolo noto hanno mostrato una buona linearità ( $R^2 > 0,9375$ ) tra i valori di Cp ottenuti e la quantità di virus sottoposta a qRT-PCR. Tale riscontro rende il presente protocollo diagnostico affidabile per una corretta quantificazione virale e di conseguenza utilizzabile in studi sperimentali che richiedono una determinazione del titolo virale.

## CONCLUSIONI

Il protocollo di qRT-PCR per AMPV messo a punto nel presente lavoro, che utilizza primer disegnati sulla sequenza del gene SH e sonde Molecular Beacon come metodo sia di discriminazione che quantificazione, rappresenta un valido strumento diagnostico ed una possibile alternativa alla RT nested-PCR attualmente in uso in molti laboratori diagnostici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barik S. (1992). Transcription of human respiratory syncytial virus genome RNA in vitro: requirement of cellular factor(s). *Journal of virology* 66: 6813-8.
2. Bayon-Auboyer MH, Jestin V, Toquin D, Cherbonnel M and N Eterradossi. (1999). Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Archives of virology* 144: 1091-1109.
3. Catelli E, Cecchinato M, Savage CE, Jones RC and CJ Naylor. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine* 24: 6476-6482.
4. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology* 146: 24-34.
5. Cecchinato M, Lupini C, Ricchizzi E, Falchieri M, Meini A, Jones RC and E Catelli. (2012). Italian field survey reveals a high diffusion of avian metapneumovirus subtype B in layers and weaknesses in the vaccination strategy applied. *Avian Diseases* 56: doi: 10.1637/10202-041312-Reg.1, in fase di stampa.
6. Cook JKA, Dolby CA, Southee DJ and APA Mockett. (1988). Demonstration of antibodies to turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared flocks of chickens. *Avian Pathology*, 17: 403-410.
7. Cook JKA and D Cavanagh (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology* 31: 117-132.
8. Ferreira HL, Spilki FR, Santos MMA, de Almeida RS and CW Arns. (2009). Comparative evaluation of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR (RRT-PCR) for detection of avian metapneumovirus subtype A. *Ciência Rural, Santa Maria* 39: 1445-1451.

9. Gough RE and RC Jones. (2008). Avian Metapneumoviruses. In Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Eds). *Diseases of Poultry* 12<sup>th</sup> edn, Ames: Blackwell Publishing, pp. 100-110.
10. Guionie O, Toquin D, Sellal E, Bouley S, Zwingelstein F, Allee C, Bougeard S, Lemiere S and N Etteradossi. (2007). Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. *Journal of virological methods* 139: 150-8.
11. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, van den Hoogen BG, Spaete R, Osterhaus AD and RA Fouchier. (2004). Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 981-986.
12. Naylor CJ and RC Jones. (1993). Turkey rinotracheitis virus: a review. *Veterinary Bulletin* 63: 439-449.
13. Naylor C, Shaw K, Britton P and D Cavanagh. (1997). Appearance of type B avian Pneumovirus in great Britain. *Avian Pathology* 26: 327-38.
14. OIE – World Organization of Animal Health (2012a). Turkey rhinotracheitis (avian metapneumovirus infections). In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 3.3.15, available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.03.15\\_TURKEY\\_RHINO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.15_TURKEY_RHINO.pdf). Accessed September 2012.
15. OIE – World Organization of Animal Health (2012b). Principles and methods of validation of diagnostic assay for infectious diseases. In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 1.1.5, available at: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards-/tahm/1.01.05\\_VALIDATION.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards-/tahm/1.01.05_VALIDATION.pdf). Accessed September 2012.
16. Tyagi S, Bratu DP and FR Kramer. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology* 16: 49-53.
17. Watzinger F, Ebner K and T Lion. (2006). Review: detection and monitoring of virus infections by real time PCR. *Molecular Aspects of Medicine* 27: 254-298.