

LAMP-LFD: MESSA A PUNTO DI NUOVI PROTOCOLLI PER LA RILEVAZIONE RAPIDA, SENSIBILE E SPECIFICA DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK SIEROTIPO 1 E SIEROTIPO 2 E DELL'HERPESVIRUS DEL TACCHINO

Mescolini G.¹, Baigent S.J.², Catelli E.¹, Nair V.K.²

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italia.*

² *The Pirbright Institute, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, United Kingdom*

Summary

Serotype-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for Marek's Disease Virus serotype 1 (MDV-1), Marek's Disease Virus serotype 2 (MDV-2), and Herpesvirus of Turkeys (HVT), using previously published LAMP primer sets targeting UL49, UL47, and HVT070 gene respectively, were optimised and adapted for use with a lateral-flow device (LFD) readout by using labelled LAMP primers. A novel LAMP primer set was designed and validated to specifically detect the recombinant HVT vaccine Vaxxitek® in LAMP-LFD tests. The MDV-1, MDV-2, HVT, and Vaxxitek® LAMP-LFD assays specifically and accurately detected their respective target viruses in DNA extracted from field samples where these viruses had previously been detected by real-time PCR. Sensitivity of the MDV-1, MDV-2, HVT, and Vaxxitek® LAMP-LFD assays was the same or 10-fold lower than the sensitivity of routine real-time PCR assay used by MDV OIE Reference Laboratory at The Pirbright Institute, Surrey, United Kingdom. Novel LAMP primers, targeting three single nucleotide polymorphisms in the UL47 gene, were designed and optimised to differentiate field MDV-1 strains from the attenuated CVI988/Rispens vaccine MDV-1 strain (DIVA assays) as MDV-1 UL49 LAMP primers did not differentiate the vaccine from field strains. These UL47 DIVA LAMP assays were highly specific in real-time LAMP, but not very sensitive and the LAMP-LFD version of the assay still needs to be optimised. "Crude" DNA extracted from samples of spleen, liver, ovary, feathers, and poultry house dust using a simple method not requiring laboratory equipment, was successfully used for serotype-specific virus detection in the MDV-1, MDV-2, and HVT LAMP-LFD assays.

INTRODUZIONE

Il virus della malattia di Marek sierotipo 1 (MDV-1 o *Gallid alphaherpesvirus* 2), un herpesvirus appartenente al genere *Mardivirus*, è l'agente eziologico della malattia di Marek (MD), una malattia neoplastica a carattere linfoproliferativo del pollo. Il controllo della MD in campo avicolo è basato sulla vaccinazione con ceppi attenuati di MDV-1, come il ceppo CVI988/Rispens, o con ceppi appartenenti allo stesso genere tassonomico ma a due specie virali diverse quali il *Gallid alphaherpesvirus* 3 o virus della malattia di Marek sierotipo 2 (MDV-2) ed il *Meleagrid alphaherpesvirus* 1 o herpesvirus del tacchino (HVT).

Nessun vaccino ad oggi disponibile per la prevenzione della MD è in grado di impedire l'infezione con ceppi di campo di MDV-1 e la conseguente replicazione ed eliminazione virale: coinfezioni con virus vaccinale e virus di campo sono frequenti negli allevamenti in cui viene applicata la vaccinazione. Di conseguenza è importante poter differenziare i ceppi di campo di MDV-1 dai ceppi vaccinali per potere: (1) confermare il sospetto diagnostico di MD in presenza di sintomatologia clinica o lesioni, (2) monitorare la presenza di ceppi di campo in assenza di sintomatologia clinica o lesioni e (3) confermare il successo vaccinale mediante rilevazione dei virus vaccinali inclusi nel protocollo vaccinale. Mentre la differenziazione fra MDV-1, MDV-2 e HVT risulta semplice per la presenza di geni unici nel genoma di MDV-1 che non trovano omologhi nelle altre due specie virali, la differenziazione tra i ceppi di campo MDV-1 e il ceppo vaccinale CVI988/Rispens risulta essere molto più difficoltosa poiché appartengono alla stessa specie virale e l'organizzazione genomica è totalmente sovrapponibile. Nel corso degli anni sono stati messi a punto svariati test di biologia molecolare (end-point PCR o real-time PCR) per rilevare e differenziare i genomi di MDV-1, MDV-2 e HVT (Handberg et al., 2001; Walkden-Brown et al., 2003; Baigent et al., 2005; Islam et al., 2006; Renz et al., 2006; Cortes et al., 2011). Il numero di metodiche in grado di differenziare i ceppi MDV-1 non vaccinali dai ceppi vaccinali appartenenti alla stessa specie virale (e.g. CVI988/Rispens) è molto più limitato (Gimeno et al. 2014; Baigent et al., 2016, Davidson et al., 2017). Le metodiche di PCR end-point o di real-time PCR sono le più utilizzate per la diagnosi di laboratorio della MD, esse però non sono adatte all'utilizzo in campo in quanto devono essere eseguite da personale formato ed in laboratori attrezzati con apparecchiature dedicate come i termociclatori.

La *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (Notomi et al., 2000; Nagamine et al., 2002) è una metodica molecolare rapida, specifica, sensibile e di semplice impiego che può superare i limiti delle metodiche molecolari tradizionali (PCR). La LAMP si avvale di una DNA polimerasi con attività di dislocazione del filamento dell'acido nucleico che permette, in condizioni isoterme di temperatura ed in combinazione con set di oligonucleotidi appositamente disegnati, l'amplificazione esponenziale della sequenza del DNA target sotto forma di ripetizioni concatenate. Essa non richiede l'impiego di apparecchiature sofisticate ma di bagni o blocchi termostati impostati ad una temperatura costante (60-65°C). La metodica LAMP ha una grande specificità intrinseca derivante dall'impiego di un set di sei primer (FIP, BIP, F3, B3, LF, LB) che si appaiano ad otto regioni genomiche della sequenza nucleotidica scelta come target. Esistono diversi metodi per la visualizzazione dei risultati di una amplificazione LAMP (Becherer et al., 2020). Uno dei più diffusi, per il basso costo, la maneggevolezza e la facilità di lettura e di interpretazione del risultato (visualizzazione di linee colorate), prevede l'utilizzo di strip per test immunocromatografici rapidi o dispositivi a flusso laterale (LFD) (Wong et al., 2018).

Sono state pubblicate in precedenza alcune metodiche LAMP specie-specifiche in grado di identificare il gene *meq* o U_1 49 di MDV-1, il gene U_1 50 di MDV-2 o il gene HVT070 di HVT (Angamuthu et al., 2012; Wei et al., 2012; Woźniakowski et al., 2013; Woźniakowski e Niczyporuk, 2015). Il risultato veniva letto attraverso la visualizzazione di un prodotto fluorescente sotto transilluminatori UV grazie

all'aggiunta di SYBR green all'amplificato LAMP, oppure attraverso la visualizzazione sotto transilluminatori UV della corsa elettroforetica in gel di agarosio del prodotto LAMP, simile a quella di un ladder.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di migliorare le caratteristiche delle metodiche LAMP già esistenti (MDV-1, MDV-2 e HVT) in modo da semplificare la lettura del risultato mediante l'impiego di LFD che velocizzano ulteriormente le tempistiche di analisi e non richiedono l'impiego di termociclatori o transilluminatori. Essendo nota l'elevata tolleranza agli inibitori della metodica LAMP (Francois et al. 2011), le metodiche sopracitate sono state testate su campioni di organi, penne e polveri sottoposti a trattamento termico e centrifugazione, bypassando l'estrazione del DNA genomico con kit commerciali. Sono infine stati messi a punto e validati due nuovi protocolli LAMP con approccio DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) in grado di differenziare fra loro il vaccino HVT ricombinante Vaxxitek® ed il vaccino CVI988/Rispens e di distinguerli dai ceppi di campo MDV-1 non vaccinali.

MATERIALI E METODI

Ceppi virali e campioni diagnostici

Per la messa a punto e l'ottimizzazione dei protocolli LAMP descritti nel presente lavoro sono stati impiegati 15 campioni di DNA virale estratti con il kit commerciale DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) da colture cellulari di fibroblasti embrionali di pollo inoculate con ceppi virali di riferimento di MDV-1, MDV-2 e HVT e da 4 diversi vaccini CVI988/Rispens commercializzati da diverse case farmaceutiche (Tabella 1).

Le metodiche sono state successivamente validate per l'applicazione su diverse matrici testando campioni di DNA estratti da 32 campioni biologici provenienti dal campo e di diversa natura (penne, organi e polvere ambientale) conferiti a fini diagnostici al laboratorio di referenza OIE per la MD (MDVRL) al Pirbright Institute (Woking, Surrey, United Kingdom). I suddetti campioni erano stati precedentemente analizzati con una metodica real-time PCR accreditata del laboratorio di referenza per la rilevazione e la differenziazione di ceppi MDV-1 vaccinali (CVI988/Rispens) e non, MDV-2 o HVT. Spesso lo stesso campione risultava positivo per due o più virus contemporaneamente. Aliquote di 11 dei suddetti campioni diagnostici, selezionate per rappresentatività di matrice, sono state risospese in PBS (4-8% w/v), trattate termicamente (95°C per 10 minuti) e centrifugate (1000 xg per 3 minuti). Il surnatante ottenuto è stato testato in LAMP-LFD senza previa estrazione del DNA con kit del commercio.

Tabella 1 - Isolati virali impiegati in questo studio

Nome del ceppo virale	Specie virale
Fc126	HVT
Vaxxitek®	rHVT ^a
Innovax	rHVT
SB-1	MDV-2
CVI988/Rispens (POULVAC MAREK CVI®, Fort Dodge Animal Health)	attMDV-1 ^b
CVI988/Rispens (RISMAVAC®, Intervet)	attMDV-1
CVI988/Rispens (CRYOMAREX® RISPENS, Merial)	attMDV-1
CVI988/Rispens (Ventri Biologicals)	attMDV-1
HPRS-B14	vMDV-1
JM102/W	vMDV-1
571	vMDV-1
RB-1B	vvMDV-1
549	vvMDV-1
Md5	vvMDV-1
595	vvMDV-1
660A	vv+MDV-1
684A	vv+MDV-1
675A	vv+MDV-1
C12-130	hvMDV-1

^a Vaccino ricombinante a base HVT

^b Patotipo MDV-1: att = attenuato, v = virulent, vv = very virulent, vv+ = very virulent +, hv=hypervirulent

Messa a punto dei protocolli LAMP

I protocolli LAMP descritti nel presente lavoro, sono stati inizialmente valutati per sensibilità e specificità, con primer non marcati, in real-time; solo in seconda battuta le reazioni sono state traslate in LAMP-LFD utilizzando primer marcati.

Per la amplificazione di HVT, MDV-2 e MDV-1, sono stati impiegati tre set di primer già descritti da Wozniakowski et al. (2013) e Wozniakowski & Niczyporuk (2015) (Tabella 2). Per l'amplificazione del vaccino Vaxxitek® HVT+IBD (Boehringer Ingelheim) e l'amplificazione differenziale del ceppo vaccinale CVI988/Rispens e MDV-1 non vaccinali due ulteriori set di primer sono stati disegnati *ex novo* impiegando il software online Primer Explorer V5. Per migliorare la sensibilità delle metodiche le sequenze di alcuni primer sono state modificate manualmente.

Il set di primer specifico per Vaxxitek® HVT+IBD, un vaccino HVT ricombinante che esprime il gene che codifica per la VP2 del virus della bursite infettiva aviaria (IBDV), è stato disegnato per amplificare la sequenza del vettore di clonaggio e del sito di inserzione in HVT (gene HVT065 e regione intergenica) del gene della VP2 di IBDV.

Il secondo set di primer disegnato *ex novo* aveva come target porzione del gene U_L47 di MDV-1, che codifica per una proteina del tegumento (Chuard et al., 2020), e la regione intergenica adiacente. I primer LAMP FIP e BIP sono stati disegnati manualmente, in due versioni, impiegando la metodica MAMA (Mismatch amplification mutation assay)

(Cha et al., 1992). Una versione è stata disegnata per il saggio mirato all'amplificazione del solo ceppo vaccinale CVI988/Rispens e l'altra per il saggio mirato all'amplificazione dei soli MDV-1 non vaccinali includendo due SNPs all'estremità 3' dei primer accoppiati ad un mismatch in penultima posizione, al fine di incrementare la specificità verso il target vaccinale o verso il target non vaccinale. Il primer LB conteneva nella sua sequenza un terzo SNP ed è stato anch'esso disegnato appositamente al fine di incrementare la specificità verso il target vaccinale o verso il target non vaccinale. I primer LF, F3 and B3 erano universali per MDV 1.

Per le reazioni LAMP in real-time è stato impiegato il termociclatore 7500FAST system® (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Stati Uniti) e per la lettura ed analisi dei risultati (curve di amplificazione e di melting) il software ABI 7500 v2.3. Le reazioni LAMP avvenivano in piastre da PCR real-time da 96 pozzetti. In ogni pozzetto venivano caricati 3 µl di DNA templatato aggiunti a 22 µl di mastermix (25 µl totali) così costituita: 15 µl di Isothermal Master Mix ISO-004 (Optigene Limited, Horsham, West Sussex, UK), 1 µl di outer primer (F3 + B3 alla concentrazione di 5 µM/primer), 1 µl di inner primer (FIP + BIP alla concentrazione di 50 µM/primer), 1 µl di loop primer (LF + LB alla concentrazione di 25 µM/primer), 4 µl di acqua per biologia molecolare. La mastermix ISO-004 conteneva un colorante intercalante del ds-DNA che viene rilevato impostando nella strumentazione il canale SYBR green/FAM per la lettura della fluorescenza. Il ciclo termico aveva una durata di 30 minuti a 65°C ed era seguito da un'analisi di melting a 98°C per 15 sec, 80°C per 1 minuto, 98°C per 1 min, 98°C per 30 sec e 80°C per 15 sec per confermare la specificità dell'amplificazione nei campioni positivi.

Per la LAMP-LFD è stata utilizzata una mix di reazione analoga a quella utilizzata per la LAMP in real-time sostituendo una coppia di primer non marcati/set con una coppia di primer marcati all'estremità 5' con Biotina (Btn), 6-FAM™ (FAM) o Digossigenina (Dig). La mix di reazione (25 µl totali) contenente 3 µl di DNA templatato veniva caricata in provette singole da 0,5 ml ed incubata per 30 minuti in un bagno termostatico impostato a 65°C. Trascorsi i 30 minuti ai 25 µl di prodotto di reazione LAMP venivano aggiunti 100 µl di buffer fornito dalla casa produttrice dell'LFD (Abingdon Health). La soluzione ottenuta (125 µl) veniva caricata nel LFD per la corsa sulla apposita striscia posizionata all'interno di una custodia di plastica. L'esito della corsa nella striscia del LFD veniva letto dopo dieci minuti di incubazione a temperatura ambiente. Le strip del test immunocromatografico rapido a flusso laterale utilizzate in questo studio possiedono tre linee: linea test 1 (T1), linea test 2 (T2) e linea di controllo (C). In corrispondenza di queste linee sono adsorbiti anticorpi che catturano in modo specifico amplificati marcati FAM-Btn (T1) oppure DIG-Btn (T2) generando bande rosa visibili ad occhio nudo. La comparsa della linea C conferma l'avvenuta corsa della soluzione nella strip dell'LFD e deve apparire dopo ogni corsa perché la reazione sia valida.

Per tutti i protocolli LAMP messi a punto (sai in real-time sia -LFD) sono state valutate sensibilità e specificità. La sensibilità analitica dei protocolli, espressa come limite di rilevazione (LoD), è stata valutata impiegando come templatato il DNA estratto dai cloni virali infettivi HVT, SB-1 (MDV-2), CVI988/Rispens, RB-1B (vvMDV-1), e Vaxxitek® (rHVT) realizzati con la tecnologia dei cromosomi artificiali batterici (BAC) disponibili presso il MDVRL. Quantità note dei suddetti cloni infettivi sono state diluite in base 10 (da 10⁰ a 10⁶ copie in 3 µl) e successivamente testate in triplicato per determinare il LoD di ogni protocollo. Il LoD è definito come la concentrazione più bassa di genoma target, espresso in numero assoluto di copie, rilevata dalla metodica di interesse (re-

al-time LAMP o LAMP-LFD) in almeno il 50% dei replicati LAMP.
Per determinare la specificità dei diversi protocolli sono stati analizzati DNA appartenenti a tutte e tre le specie virali di interesse.

Tabella 2 - Set di primer per real-time LAMP e LAMP-LFD (inner primer marcati con FAM e Btn in posizione 5') per HVT, MDV-2 ed MDV-1

Virus - gene target	Tipologia di primer	Nome e sequenza del primer	Riferimento bibliografico
HVT - HVT070	Outer	HVT-F3: 5'-ATAAATTATATCGCTAGGACAGAC-3' HVT-B3: 5'-ACGATGTGCTGTCGTCTA-3'	Wozniakowski et al., 2013
	Inner	HVT-FIP: 5'-FAM-CCAGGGTATGCATATTCATAA-CA <i>GTTTTCCAAACGACCTTTATCCCA-3'</i> * HVT-BIP: 5'-Btn-CCAGAAATTGCACGCACGA- <i>GTTTT</i> AGAATTTGTGCATTTAGCCTT-3'	
	Loop	HVT-LF: 5'-TTGAGAAGAGGATCTGACTG-3' HVT-LB: 5'-GCGTCATTGGTTTTACATTT-3'	
MDV-2 - UL50	Outer	MDV2-F3: 5'-GTTCTCCGTCGATGAAGCG-3' MDV2-B3: 5'-GTCAATTCGCCAGCACAAC-3'	Wozniakowski et al., 2013
	Inner	MDV2-FIP: 5'-FAM-ATAACGCGAAGACAGCGCG- <i>GTTT</i> <i>TTATGCGAGGAACCCAGAAGG-3'</i> MDV2-BIP: 5'-Btn-ACTGTGCGATCTCGTTGCC- <i>CTTTT</i> GCCACTCGTACACCTAGA-3'	
	Loop	MDV2-LF: 5'-TTCTTCTATATAACAGGTCC-3' MDV2-LB: 5'-TATGAAATATGTGCGTTAGA-3'	
MDV-1 - UL49	Outer	MDV1-F3: 5'-GATGGGGGAAGCCGAAAC-3' MDV1-B3: 5'-CACTGACYACGATATCCGC-3'	Wozniakowski & Niczyporuk, 2015 (sequenze modificate nel presente studio)
	Inner	MDV1-FIP: 5'-FAM-CCGCCGCTCTTGACGT-TCTTTTG TGCCCCGAAACTATTGGAA-3' MDV1-BIP: 5'-Btn-AATCAAATCGCCAGATCCGG- <i>GATT</i> <i>TTGATGGCGACGCGAAGTTG-3'</i>	
	Loop	MDV1-LF: 5'-CCCCTGGGATAATCCAGACTC-3' MDV1-LB: 5'-CTCATCGTACACATAACCCTCGC-3'	

* Primer marcati utilizzati in LAMP-LFD con FAM = 6-carboxyfluorescein o Btn = Biotin

Test LAMP-LDF su DNA estratti da campioni diagnostici e su campioni diagnostici trattati termicamente

I DNA estratti dai 32 campioni diagnostici provenienti dal campo e le 11 aliquote di organi o polvere ambientale trattate termicamente sono stati testati con i protocolli LAMP-LFD per HVT, MDV-1 e MDV-2.

RISULTATI

Sensibilità dei protocolli di real-time LAMP e LAMP-LFD

La sensibilità dei 6 protocolli di real-time LAMP e dei 6 protocolli di LAMP-LFD messi a punto nel presente lavoro è riportata in Tabella 3 ed è espressa come LoD.

Tabella 3 - Sensibilità delle metodiche di real-time LAMP e LAMP-LFD

Metodica	LoD (numero copie di genoma)		
	Real-time LAMP	LAMP-LFD	MDVRL real-time PCR*
HVT (generico)	100	100	10 (gene sORF1)
HVT Vaxxitek®	100	100	Non disponibile
MDV-2	10	100	100 (gene DNA-pol)
MDV-1 (generico)	100	100	100 (gene pp38)
MDV-1 CVI988/Rispens	10000	-	100 (gene pp38)
MDV-1 di campo	10000	10000	100 (gene pp38)

* Paragone con la sensibilità dei protocolli real-time PCR del MDVRL

Specificità dei protocolli di real-time LAMP e LAMP-LFD

La specificità dei protocolli real-time LAMP e LAMP-LFD messi a punto nel presente lavoro è riportata in Tabella 4. Ogni protocollo ha permesso l'amplificazione specifica dei genomi target (Tabella 4)

Tabella 4 - Specificità dei protocolli di real-time LAMP e LAMP-LFD

DNA virali	Protocollo					
	HVT (generico)	HVT Vaxxitek®	MDV-2	MDV-1 (generico)	MDV-1 CVI988/Rispens	MDV-1 non vaccinale
HVT Fc126	✓	✗	✗	✗	✗	✗
rHVT-Vaxxitek®	✓	✓	✗	✗	✗	✗
rHVT-Innovax®	✓	✗	✗	✗	✗	✗
MDV-2 SB-1	✗	✗	✓	✗	✗	✗
CVI988/Rispens	✗	✗	✗	✓	✓*	✗*
MDV-1 di campo	✗	✗	✗	✓	✗*	✓*

✓ - Amplificazione del genoma target

✗ - Nessuna amplificazione

* - La specificità delle metodiche MDV-1 CVI988 e non vaccinale è stata testata su 4 vaccini CVI988/Rispens di differenti case farmaceutiche e su 11 ceppi di campo MDV-1 a diversa virulenza (v, vv e vv+)

Test LAMP-LFD su DNA estratti da campioni diagnostici

Dei 32 DNA estratti dai campioni diagnostici quelli positivi per HVT in real-time PCR (valori Ct compresi tra 24 e 38), sono risultati tutti positivi anche in LAMP-LFD. I campioni diagnostici positivi per MDV-2 in real-time PCR sono risultati positivi anche in LAMP-LFD quando i valori Ct erano compresi tra 20 e 29. Soltanto un campione con valore di Ct 36 in real-time PCR per MDV-2, è risultato negativo in LAMP-LFD. I campioni diagnostici positivi per MDV-1 e/o CVI988/Rispens in real-time PCR (valori Ct compresi tra 18 e 33), sono risultati tutti positivi anche in LAMP-LFD (test MDV-1 generico). La metodica MDV-1 DIVA ha fornito risultati concordanti con quelli della PCR real-time in real-time LAMP (i ceppi classificati come di campo con una metodica lo erano anche con l'altra così come i ceppi vaccinali CVI988/Rispens) ma non in LAMP-LFD dove si evidenziavano false positività dovute probabilmente alla formazione di prodotti aspecifici che si legavano alle linee della striscia del LFD generando una linea rosa visibile. I prodotti aspecifici risultavano invece chiaramente distinguibili dai prodotti specifici analizzando le curve di amplificazione e le relative analisi di melting in real-time LAMP.

Test LAMP-LFD su campioni diagnostici trattati termicamente

I tre protocolli LAMP-LFD per HVT, MDV-2 e MDV-1 eseguite a partire da matrici organiche e polveri ambientali sottoposte al solo trattamento termico e centrifugazione, hanno dato risultati concordanti con le metodiche real-time PCR e LAMP-LFD eseguite sul DNA estratto con kit commerciali.

DISCUSSIONE

Tutti i protocolli LAMP messi a punto nel presente lavoro per l'identificazione di HVT, MDV-1 e MDV-2 sono risultati altamente specifici e sensibili. La sensibilità analitica delle metodiche LAMP-LFD è risultata paragonabile a quella delle metodiche di real-time PCR utilizzate dal MDVRL OIE al Pirbright Institute per la diagnostica di routine (Baigent et al., 2016; López-Osorio et al., 2019) con l'unica eccezione della metodica LAMP DIVA per MDV-1 che, sebbene abbia mostrato un'alta specificità possedeva una bassa sensibilità.

Le tre metodiche LAMP-LFD messe a punto per l'identificazione di HVT, MDV-1 e MDV-2 sono state testate con successo anche a partire da campioni di campo trattati termicamente senza estrazione del DNA; tale peculiarità aggiunge convenienza e rapidità all'impiego in campo di questa metodica.

La messa a punto di metodiche LAMP per l'amplificazione differenziale di ceppi vaccinali, inclusi vaccini di nuova generazione quali Vaxxitek®, ottenuta nel presente lavoro ha una grande ricaduta pratica considerata l'importanza che sempre più sta acquisendo il monitoraggio della cinetica vaccinale nelle popolazioni vaccinate.

È stata sviluppata una metodica DIVA basata sul gene UL47 di MDV-1 per la differenziazione del ceppo vaccinale CVI988/Rispens dai ceppi di campo MDV-1. Questo segmento genomico è stato individuato per la prima volta in questo studio come target ottimale per differenziare i ceppi di campo MDV-1 dal ceppo vaccinale CVI988/Rispens. Appartenendo alla stessa specie virale il genoma del vaccino CVI988/Rispens presenta la stessa organizzazione genica di MDV1 non vaccinale, ed un'alta percentuale di identità nucleotidica con esso (Spatz et al., 2007) per questa ragione lo sviluppo di metodiche molecolari DIVA sensibili e specifiche risulta

complicato. I test DIVA più efficienti e affidabili sviluppati fino ad ora si basano sull'amplificazione in PCR end-point e successivo sequenziamento del gene *meq* di MDV-1 o sulla amplificazione differenziale in real-time PCR utilizzando sonde TaqMan® o saggi MAMA (Gimeno et al 2014; Baigent et al., 2016, Davidson et al., 2018). La frequenza con cui si verificano nelle popolazioni vaccinate coinfezioni con più ceppi vaccinali di diversa specie e con ceppi vaccinali e ceppi di campo MDV-1, rende sempre più necessaria la messa a punto di test LAMP con approccio DIVA.

CONCLUSIONI

Le metodiche LAMP-LFD messe a punto nel presente studio rappresentano un passo avanti nella diagnosi molecolare di MD e nel monitoraggio della cinetica vaccinale nelle popolazioni vaccinate. Le metodiche LAMP-LFD rendono infatti possibile la diagnosi accurata direttamente in campo o in piccoli laboratori diagnostici grazie alla rapidità di esecuzione del test e alla semplicità di interpretazione del risultato.

BIBLIOGRAFIA

1. Angamuthu R, Baskaran S, Gopal DR, Devarajan J, Kathaperumal K. (2012). Rapid detection of the Marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol.* 50(3):961-5.
2. Baigent SJ, Nair VK, Le Galludec H. (2016). Real-time PCR for differential quantification of CVI988 vaccine virus and virulent strains of Marek's disease virus. *J Virol Methods.* 233:23-36.
3. Baigent SJ, Petherbridge LJ, Howes K, Smith LP, Currie RJ, Nair VK. (2005). Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *J Virol Methods.* 123(1):53-64.
4. Becherer L, Borst N, Bakheit M, Frischmann S, Zengerle R and von Stetten F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods* 12, 717-746
5. Cha RS, Zarbl H, Keohavong P, Thilly WG. (1992). Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene. *PCR Methods Appl.* 2(1):14-20.
6. Chuard A, Courvoisier-Guyader K, Rémy S, Spatz S, Denesvre C, Padeloup D. (2020). The Tegument Protein pUL47 of Marek's Disease Virus Is Necessary for Horizontal Transmission and Is Important for Expression of Glycoprotein gC. *J Virol.* 95(2):e01645-20.
7. Cortes AL, Montiel ER, Lemiere S, Gimeno IM. (2011). Comparison of blood and feather pulp samples for the diagnosis of Marek's disease and for monitoring Marek's disease vaccination by real time-PCR. *Avian Dis.* 55(2):302-10.
8. Davidson I, Natour-Altoury A, Raibstein I, Dahan Y. (2017). Differential amplification of Marek's disease CVI988 vaccine and of wild-type isolates from organs of commercial chickens using single or duplexed probes in real-time PCR. *Avian Pathol.* 46(6):610-614.
9. Francois P, Tangomo M, Hibbs J, Bonetti EJ, Boehme CC, Notomi T, Perkins MD, Schrenzel J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 62(1):41-8.

10. Gimeno IM, Dunn JR, Cortes AL, El-Gohary Ael-G, Silva RF. (2014). Detection and differentiation of CVI988 (Rispens vaccine) from other serotype 1 Marek's disease viruses. *Avian Dis.* 58(2):232-43.
11. Handberg KJ, Nielsen OL, Jørgensen PH. (2001). The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens. *Avian Pathol.* Jun;30(3):243-9.
12. Islam A, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. (2006). Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR. *J Virol Methods.* 132(1-2):127-34.
13. López-Osorio S, Villar D, Piedrahita D, Ramírez-Nieto G, Nair V, Baigent S, Chaparro-Gutiérrez J. (2019). Molecular detection of Marek's disease virus in feather and blood samples from young laying hens in Colombia. *Acta Virol.* 63(4):380-391.
14. Nagamine K, Hase T, Notomi T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16(3):223-9. doi: 10.1006/mcpr.2002.0415. PMID: 12144774.
15. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12):E63.
16. Renz KG, Islam A, Cheetham BF, Walkden-Brown SW. (2006). Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens. *J Virol Methods.* 135(2):186-91.
17. Spatz SJ, Petherbridge L, Zhao Y, Nair V. (2007). Comparative full-length sequence analysis of oncogenic and vaccine (Rispens) strains of Marek's disease virus. *J Gen Virol.* 88(Pt 4):1080-1096.
18. Wei X, Shi X, Zhao Y, Zhang J, Wang M, Liu C, Cui H, Hu S, Quan Y, Chen H, Wang Y. (2012). Development of a rapid and specific loop-mediated isothermal amplification detection method that targets Marek's disease virus meq gene. *J Virol Methods.* 183(2):196-200.
19. Walkden-Brown, S.W, Groves,P.J., Islam A.F.M.F, Burgess S.K., Arzey K.E., Mascord, L., Young P.L., (2003). Differentiation of Marek's disease virus serotypes using PCR: research and field experience. Proceedings of the 15th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, 10-12 febbraio 2003, 15, 192-196.
20. Wong YP, Othman S, Lau YL, Radu S, Chee HY. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 124(3):626-643.
21. Woźniakowski G, Niczyporuk JS. (2015). Detection of specific UL49 sequences of Marek's disease virus CVI988/Rispens strain using loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 221:22-8.
22. Woźniakowski G, Samorek-Salamonowicz E, Kozdruń W. (2013). Comparison of loop-mediated isothermal amplification and PCR for the detection and differentiation of Marek's disease virus serotypes 1, 2, and 3. *Avian Dis.* 57(2 Suppl):539-43.