



# SVILUPPO DI METODI DIAGNOSTICI PER INDAGINI DI SCREENING E DI CONFERMA NEI CONFRONTI DEL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA BOVINA

**Responsabile Scientifico  
Francesco Feliziani**

**C. Casciari, C. Torresi, M. Giammarioli**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy.*

## INTRODUZIONE

Il virus dell'immunodeficienza bovina (BIV) appartiene alla famiglia delle Retroviridae, genere Lentivirus, che comprende Human, Simian, Feline Immunodeficiency virus (HIV, SIV, FIV), Small ruminant lentiviruses (SRLV) e Anemia infettiva degli equini (EIAV). Come tutti i virus appartenenti alla famiglia Retroviridae, il genoma del BIV è costituito da due copie di RNA a singolo filamento che viene retrotrascritto a DNA bicatenario e integrato come provirus nel genoma della cellula ospite.

Tale virus è stato isolato alla fine degli anni settanta, in studi finalizzati alla diagnosi del Virus della Leucosi Bovina Enzootica. La presenza di questo virus è ampiamente documentata nella popolazione bovina dell'emisfero australe mentre studi isolati sono stati condotti nel resto del mondo e più in particolare in Europa; nonostante tutto questo poco si conosce riguardo l'epidemiologia dell'infezione da BIV e il possibile ruolo che questo virus possa rivestire come favorente l'insorgenza di altre condizioni patologiche.

In questo ambito è sembrato opportuno porre le basi per una più approfondita analisi delle conoscenze epidemiologiche legate all'infezione da BIV nella popolazione bovina e bufalina italiana attraverso l'impiego di tecniche diagnostiche all'avanguardia.

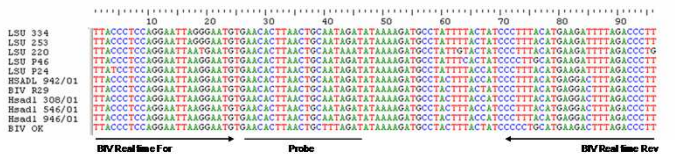
Primer	Sequenza	Lunghezza dell'amplificato
BIV For	5'- CCCCAGGTCCCATCAACATTCATC -3'	381 bp
BIV Rev	5'- GTCTTCCCACATCCGTAACATCTCC -3'	

**Tabella 1** - Sequenze nucleotidiche dei primer impiegati per l'amplificazione mediante RT-PCR del gene gag di BIV.

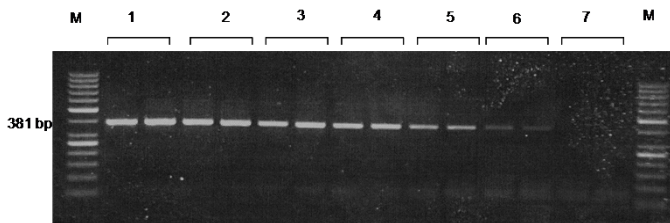
## Materiali e Metodi

Data la difficoltà di reperire campioni sicuramente positivi e negativi si è provveduto alla messa a punto di una RT-PCR impiegando come template l'RNA virale (isolato R29). In questa prima fase si è scelto di utilizzare primer desunti della letteratura e specifici per la regione gag (Tab. 1).

Pur avendo ottenuto risultati positivi in termini di specificità e sensibilità, si è scelto di implementare anche una Real-Time PCR al fine di migliorare le performance della prova. In questo secondo caso si è impiegata la regione pol di isolati disponibili in banca dati per il disegno di primer e sonde (Fig. 1).



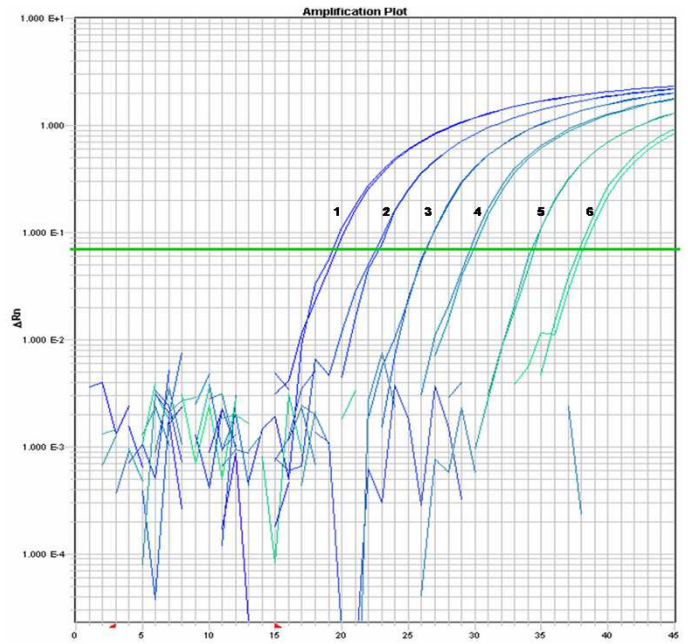
**Figura 1** - allineamento delle sequenze nucleotidiche di pol degli isolati di BIV disponibili in banca dati per il disegno di primer e sonde impiegati in Real-time PCR. Accession number: LSU 334: AF083924; LSU 253: AF083923; LSU 220: AF083920; LSU P46: AF083921; LSU P24: AF083922; HSADL 942/01: AY348692; BIV R29: L04972; Hsad1 308/01: AY348691; Hsad1 546/01: AY348690; Hsad1 946/01: AY348689; BIV OK: U34389.



**Figura 2** - RT-PCR su RNA virale estratto da colture cellulari infette da BIV R29: prova di sensibilità. 1: 360 ng di RNA virale in duplicato. 2: 36 ng. 3: 3.6 ng. 4: 0.36 ng. 5: 36 pg. 6: 3.6 pg. 7: 0.36 pg. M: marcatore di peso molecolare.

## RISULTATI

L'applicabilità dei metodi è stata provata attraverso l'esame di campioni estratti da colture cellulari infette da BIV, prevedendo anche gli opportuni controlli negativi. Il metodo di Real-Time PCR ha dimostrato elevata sensibilità e specificità (Fig. 3), ma anche le performance del test PCR tradizionale sono apparse soddisfacenti (Fig. 2).



**Figura 3** - Real time PCR su RNA virale estratto da colture cellulari infette da BIV R29: prova di sensibilità. 1: 360 ng di RNA virale in duplicato. 2: 36 ng. 3: 3.6 ng. 4: 0.36 ng. 5: 36 pg. 6: 3.6 pg.

## DISCUSSIONE

Dati i risultati incoraggianti ottenuti, si intende prendere spunto da questa ricerca per validare i metodi diagnostici attraverso l'impiego di campioni bovini di campo. Tuttavia, reperire materiale sicuramente positivo e negativo in assenza di gold standard potrà rivelarsi difficoltoso e, quindi, si intende affiancare i metodi di ricerca diretta del virus con altri metodi di tipo indiretto.