

DIAGNOSI DI LABORATORIO

L'esito di un test diagnostico è fortemente condizionato dalla qualità dei campioni, dalle condizioni di stoccaggio e dalle manualità con cui viene effettuato il prelievo. Premesso questo, per quanto riguarda la BT, vi è una precisa normativa Comunitaria che stabilisce il comportamento da tenere per quanto riguarda il tipo di campioni da prelevare, la loro spedizione e le metodiche diagnostiche da effettuare qualora si sospetti un focolaio di BT o si debba accertare la positività di animali a questa malattia.

Nel concreto, la diagnosi di laboratorio può essere diretta o indiretta: la prima evidenzia direttamente il virus o l' antigene virale, la seconda gli anticorpi nei confronti del virus.

Prove di laboratorio per la diagnosi diretta (identificazione dell'agente infettante)

Campioni da prelevare

Il comportamento da tenere in tali casi è differente a seconda che si debba procedere su animali vivi o morti.

- Animali vivi: raccolta di un campione di sangue con anticoagulante (EDTA) durante la fase viremica, che spesso coincide con il periodo febbrile.
- Animali morti: prelievo di milza, linfonodi e/o altri organi ritenuti utili. Un campione di sangue può essere eventualmente prelevato dalle camere cardiache. Nei soggetti in avanzato stato di putrefazione il virus può essere isolato dal midollo di un osso lungo.
- Feti e animali nati morti: si possono effettuare gli stessi campionamenti di cui sopra, con l'aggiunta di tessuto cerebrale.

Tutto il materiale prelevato deve essere mantenuto ad una temperatura di +4°C e analizzato in laboratorio quanto prima; in alternativa deve essere stoccato a una temperatura di -70°C.

L'identificazione diretta del BTV è richiesta nel caso di commercio internazionale di animali.

Le prove previste dal Terrestrial Animal Health Code dell'OIE (aggiornato a Maggio 2014) sono l'isolamento su uova embrionate di pollo e l'isolamento su tessuto-colture.

La prova biologica tramite l'infezione di pecore può essere utile nel caso in cui il titolo virale del campione è molto basso (come nel caso di infezioni non recenti) o quando non sono disponibili dei laboratori adeguati.

Inoculazione di uova embrionate di pollo

I tempi richiesti per la prova variano dai 14 ai 35 gg.

Si usano sospensioni di globuli rossi lavati oppure campioni di milza o di linfonodi omogeneizzati.

Vengono impiegate da 5 a 12 uova embrionate di 9-12 giorni di età, e l'inoculazione avviene per via endovenosa a livello della membrana allantoidea (la metodica non è semplice e richiede esperienza).

Le uova sono incubate in camera umida a 32-34°C per una settimana e vengono controllate quotidianamente. Data la difficoltà della metodica, la morte degli embrioni entro le prime 24h post-inoculazione è considerata non specifica; quella che si verifica tra il 2° ed il 7° giorno può essere causata dalla infezione virale, e pertanto gli embrioni vengono raccolti e conservati a 4°C; gli embrioni sopravvissuti vengono soppressi.

Successivamente, previa asportazione della testa e dell' intestino, gli embrioni vengono omogeneizzati e l'omogenato chiarificato tramite centrifugazione.

Se presente, il virus si localizza nel surnatante, e dopo un'ulteriore amplificazione su monostrato cellulare, può essere identificato utilizzando un'ELISA diretta o l'immunofluorescenza. Il virus può anche essere rilevato direttamente dal cervello o dal fegato degli embrioni inoculati usando un'ELISA diretta.

Se non si riscontra alcun decesso in seguito alla prima inoculazione si può tentare un secondo passaggio su altre uova embrionate, o su colture cellulari. Attualmente, data la difficoltà della metodica e il tempo lungo di risposta, l'inoculazione di uova embrionate di pollo non è quasi mai utilizzata

Inoculazione di colture cellulari

Si può inoculare il materiale ritenuto infettante (sangue e organi), opportunamente trattato, su monostrati di cellule sensibili al BTV, quali cellule Vero (cellule renali di scimmia verde africana), cellule BHK-21 (Baby Hamster Kidney-21), cellule derivanti dalla zanzara *Aedes albopictus* (AA) e cellule di *Culicoides variipennis* (Kc).

La tecnica fornisce risultati migliori se preceduta da inoculazione su uova embrionate di pollo.

Nel caso di passaggi su cellule AA o Kc, sono necessari ulteriori passaggi su cellule di mammiferi, in quanto l'effetto citopatico non è sempre osservabile su cellule di insetto.

Le colture cellulari inoculate vengono mantenute a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂, e l'effetto citopatico (escluse le cellule Kc) è atteso entro 5-7 giorni. Talvolta sono necessari uno o più passaggi "ciechi" prima di osservare la comparsa delle lesioni cellulari.

In caso di effetto citopatico, l'identificazione del virus viene effettuata tramite ELISA diretta, immunofluorescenza, test di virus neutralizzazione o PCR.

Anche questa metodica è ormai usata raramente per la diagnosi di BT.

Reazione a catena della polimerasi (Polymerase chain reaction, PCR)

La PCR è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione e l'identificazione di specifiche sequenze caratteristiche del virus da ricercare. È una metodica molto veloce, in quanto in breve tempo dall'arrivo dei campioni al laboratorio (anche nella stessa giornata) è possibile rilevare l'eventuale presenza di acido nucleico virale in diverse matrici organiche (sangue, organi e insetti).

Inoltre, le nuove tecniche di PCR permettono una valutazione approssimativa della carica virale nei campioni e la classificazione del sierotipo infettante.

È da notare, tuttavia, che la PCR rivela la presenza di RNA virale, anche molto tempo dopo che il virus non è più infettante e non è in grado di causare infezione né negli insetti né in altri animali. Pertanto, un risultato positivo in PCR non implica necessariamente la presenza di virus infettante.

Identificazione del sierogruppo

La tipizzazione dei sierogruppi inclusi nel genere *Orbivirus* (famiglia Reoviridae) si basa sulla reattività di antisieri specifici standard con proteine virali, quali la VP7, caratteristica di ogni sierogruppo.

Le frequenti false positività verificatesi nel passato con l'utilizzo di anticorpi policlonali anti-BT, per cross-reazione con altri sierogruppi del genere *Orbivirus*, hanno indirizzato i laboratori verso l'utilizzo di anticorpi monoclonali siero-gruppo specifici (MAb).

Le metodiche più utilizzate sono:

1. Immunocapture ELISA

Sebbene caratterizzato da scarsa sensibilità, è una metodica molto usata poiché è rapida e non dà cross-reazioni con virus correlati. Viene applicata ad organi di embrioni di pollo, colture cellulari o insetti infetti. Il virus o le particelle del core vengono legate dagli anticorpi adsorbiti sui pozzetti di piastre per ELISA, e l'utilizzo di un secondo tipo di anticorpi ne permette l'identificazione.

2. Immunofluorescenza diretta

Prevede l'impiego di un anticorpo monoclonale anti-BTV coniugato con fluoresceina, utilizzato secondo procedure standard di immunofluorescenza.

Identificazione del sierotipo

1. Virus neutralizzazione

Sfrutta la capacità del virus di neutralizzare antisieri sierotipo-specifici ottenuti da animali di laboratorio (porcellini d'India o conigli). Si preferisce usare sieri di queste specie in quanto presentano minore cross-reattività sierotipica di quelli ottenuti da ovini o bovini.

Prove di laboratorio per la diagnosi indiretta (identificazione degli anticorpi anti-BTV)

Si basano sull'identificazione degli anticorpi diretti contro il BTV. Questi possono essere rilevati con diverse metodiche, differenti a livello di sensibilità e specificità.

Campioni da prelevare

Le prove sierologiche per evidenziare la presenza di anticorpi negli animali immunocompetenti, venuti a contatto con il BTV, si effettuano su campioni di siero.

Il siero va mantenuto a 4°C e rapidamente inviati in laboratorio oppure può essere conservato a -20°C per vari mesi.

Fissazione del complemento

La tecnica, utilizzata fino al 1982, attualmente ha scarsissimo impiego in quanto caratterizzata da bassa sensibilità e specificità, dovuta a possibili reazioni crociate con virus antigenicamente correlati.

Immunodiffusione in gel di Agar (AGID)

Dal 1982, e per lungo tempo, è stato il test riconosciuto a livello internazionale per la movimentazione degli animali, ma attualmente non è ritenuto sufficientemente accurato da poter essere utilizzato per tale scopo.

Ha sensibilità e specificità inferiori ad altre prove, fra le quali l'ELISA, in quanto può evidenziare anticorpi diretti contro altri virus del genere *Orbivirus*, in particolare contro il virus della malattia emorragica epizootica, dando falsi positivi.

Inoltre, il metodo prevede l'utilizzo di antigeni purificati, la cui produzione non è semplice. A seguito di queste problematiche, l'AGID è stato progressivamente sostituito da test più specifici, quale l'ELISA competitiva.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) indiretta

E' stata sostituita dalla tecnica dell'ELISA competitiva di seguito descritta.

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) competitiva

E' un test caratterizzato da elevata specificità e sensibilità. La specificità è dovuta all'impiego di diversi tipi di anticorpi monoclonali sierogruppo-specifici, che sono tutti ugualmente in grado di legare la regione aminotermine della proteina maggiore del core, VP7.

La metodica è stata standardizzata da studi comparativi effettuati in diversi laboratori internazionali di riferimento.

La procedura prevede di porre il siero in esame a contatto con l'antigene noto. Se nel siero sono presenti gli anticorpi, questi si legheranno all'antigene occupando i siti di legame, competendo (da cui il nome) con gli anticorpi monoclonali coniugati con enzima aggiunti successivamente. Questi ultimi infatti, non trovando siti di legame liberi, non si legano e, dopo opportuni lavaggi, l'aggiunta del successivo substrato cromogeno non determina colorazione. Al contrario, in assenza di anticorpi sierici, si ha sviluppo di colorazione la cui intensità viene letta allo spettrofotometro.

Il test, raccomandato dall'OIE, permette di evidenziare gli anticorpi contro tutti i 26 sierotipi del BTV, ed inoltre, data l'elevata specificità, non si hanno reazioni verso antigeni correlati o proteine cellulari. La lettura, infine, è effettuata tramite spettrofotometro con risultati oggettivi che possono essere ottenuti in poche ore. Attualmente, è il test di screening sierologico nell'ambito del piano di sorveglianza.

Sieroneutralizzazione

E' una prova molto sensibile ed altamente specifica, in grado di rilevare gli anticorpi neutralizzanti sierotipo-specifici nel siero di animali venuti a contatto con il BTV.

Il test si basa sulla capacità degli antisieri sierotipo-specifici, eventualmente presenti nel siero in esame, di neutralizzare l'effetto citopatico del BTV su colture cellulari.

I sieri, diluiti per raddoppio a partire dalla diluizione di 1:10 in piastre da microtitolo a 96 pozzetti, sono messi a contatto con diversi sierotipi di BTV (scelti in base ai dati epidemiologici) preventivamente titolati, per consentire la eventuale neutralizzazione virale. Ai pozzetti sono aggiunte successivamente cellule Vero come sistema rilevatore dell'attività del virus. La lettura delle piastre si effettua dopo 4-7 giorni, e valuta la presenza o meno di effetto citopatico sul tappeto cellulare. Un siero è considerato positivo per un determinato sierotipo virale quando è in grado di inibirne l'effetto citopatico.

I vantaggi della sieroneutralizzazione sono la possibilità di identificare il sierotipo coinvolto nella sieroconversione e la titolazione del titolo anticorpale.

Documento aggiornato al Giugno 2014