

**PCR IN SITU PER MAEDI VISNA VIRUS:
COMPARAZIONE FRA TECNICHE "DIRETTE" E
"INDIRETTE"**

Sanna Ennio, Sanna Maria Paola, Farigu Serrazina, Leoni Antonio, Nieddu Antonio Mario

Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico-Chirurgica Veterinaria, Università di Sassari.

Riassunto

La PCR in situ (IS-PCR) è una tecnica impiegata presso numerosi laboratori di patologia molecolare, ormai quasi routinariamente, allo scopo di evidenziare DNA o RNA genomico, batterico e virale. Essa consente indagini retrospettive su materiali d'archivio inclusi in paraffina e ai vantaggi delle metodiche in fase liquida associa la possibilità di visualizzare il target nei suoi naturali contesti topografici. Attualmente, le procedure utilizzate sono di tipo "diretto" o "indiretto": le prime marcano le sequenze di interesse già durante la fase di amplificazione mentre le seconde, dopo una PCR in assenza di marcatori, impongono il successivo impiego di sonde geniche contenenti le molecole rivelatrici. In letteratura sono comparsi studi basati su entrambi gli approcci, ma è opinione diffusa che le tecniche "dirette" possano causare la comparsa di segnali aspecifici dovuti all'attività primer-indipendente della TAQ polimerasi.

Allo scopo di verificare l'affidabilità di procedure "dirette" di recente proposizione, abbiamo eseguito prove di PCR in situ per Maedi Visna Virus su tessuti polmonari e mammari ovini naturalmente infetti e su controlli negativi etero- e intraspecifici. In parallelo sono state eseguite tecniche "indirette" da lungo tempo in uso presso il nostro laboratorio.

I risultati ottenuti dimostrano che l'incorporazione del marker nel mix di amplificazione, anche in presenza di pre-trattamenti termici, causa lo sviluppo di numerosi e forti segnali intranucleari nei controlli negativi etero ed intraspecifici. Nei tessuti mammari di cagna e gatta, il cromogeno marca infatti i nuclei degli epitelii secernenti e duttali e dei fibroblasti mentre, nei reni di agnello, esso si attesta in elementi mesangiali e tubulari. Conseguentemente, lo spettro di positività osservabile su mammelle e polmoni infetti da MVV, assai vasto e comprensivo di fibroblasti e cellule mucolari lisce, risulta completamente inattendibile. Viceversa, l'impiego di tecniche indirette consente di minimizzare il

background e non dà luogo a segnali aspecifici sui controlli negativi. La distribuzione del DNA provirale di MVV in ambito polmonare appare limitata, rispetto alle procedure dirette, ai soli macrofagi, pneumociti II ed epitelii bronchiolari e, nei tessuti mammari, agli epitelii secernenti e ai macrofagi.

In conclusione, l'impiego della IS-PCR "diretta", in assenza di precauzioni volte a prevenire l'attività primer-indipendente della TAQ polimerasi, non appare utile a definire i citotipi coinvolti nell'infezione da MVV.