

COMUNICAZIONE 3

APPLICAZIONE E CONFRONTO CRITICO FRA L'UTILIZZO DELLE UOVA EMBRIONATE DI POLLO E POLYMERASE CHAIN REACTIONS, PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

F. Paganelli, G. Tosi, P. Massi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì

Parole chiave: virus della bronchite infettiva aviaria, polymerase chain reaction, uova embrionate di pollo

Application and critical comparison of the use embryonated chicken eggs with the polymerase chain reaction, to identify the Infectious bronchitis virus

Key words: infectious bronchitis virus, polymerase chain reaction, embryonated chicken eggs

Summary: Infectious bronchitis virus (IBV), the prototype of the coronavirus family, is major cause of economic losses in the poultry industry and can be involved in respiratory disease, nephritis and poor egg production and quality. This study compares the polymerase chain reaction (PCR) with virological traditional methods, normally used for detection of IBV. The PCR show high sensitivity and specificity, however, the PCR is less time consuming in comparison to virus isolation.

Correspondence: Francesca Paganelli – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì – Via Marchini 1, 47100 Forlì – Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Il virus della bronchite infettiva aviaria (IBV) è un prototipo della famiglia Coronaviridae. È una malattia virale acuta, infettiva, sistemica ed altamente contagiosa del pollo. Presenta principalmente sintomi e lesioni respiratorie, renali o dell'apparato riproduttivo (2). Da ottobre 2000 a Luglio 2001 per ogni campione, che per dati anamnestici, clinici e anatomo-patologici rispecchiava una sintomatologia riferibile alla bronchite infettiva aviaria (IBV) è stato seguito uno specifico iter diagnostico. Per la ricerca dell'agente virale si è applicata sia la metodica classica, che utilizza le uova embrionate di pollo SPF, sia la PCR. Il virus dell'IB è pleomorfo, di 80-200 nm di diametro, con genoma RNA a singolo filamento e provvisto di envelope. Il genoma virale è composto da 27.5 Kb, che codifica per tre proteine strutturali: la proteina S, la proteina M glicosilata della membrana e la proteina N fosforilata del nucleocapside. La proteina S presenta 8 determinanti antigenici, 6 in S1 e 2 in S2. La proteina S è risultata estremamente variabile, soprattutto la subunità S1. Numerosi sierotipi noti differiscono, infatti, tra loro per più del 20% dei loro aminoacidi di questa proteina. La subunità S1 è responsabile della virus neutralizzazione (VN), dell'inibizione dell'emoagglutinazione (HI) e della differenziazione sierotipica (4). Con la PCR si va a ricercare ed amplificare proprio un locus genico della subunità S1, per potere determinare la presenza o meno dell'IBV. Nel presente lavoro si è cercato di mettere a punto un efficace protocollo di lavoro per l'identificazione dell'IBV tramite PCR, e di conseguenza valutare la sua vera maggior sensibilità e specificità rispetto alla metodica classica, senza dimenticare la possibilità di ottenere una diagnosi in tempi più brevi.

Materiali e Metodi

Il campione di partenza, in base alle lesioni presenti nell'animale, è costituito da raschiato tracheale, polmone, rene, tonsille cecali e ovidutto; dopo una omogenizzazione con PBS antibiotato, viene centrifugato a 3,000x g e filtrato su filtri di 450 nm. A questo punto il campione viene inoculato su uova SPF di 9 gg. per via intrallantoidea per 3 passaggi consecutivi. L'identificazione del virus si basa sulle

lesioni tipiche dell'embrione: mortalità, nanismo, arrotolamento e penne arricciate. Inoltre si valutano sia gli esiti dell'immunodiffusione su agar gel con antisieri IBV, sia la morfologia del virus tramite la microscopia elettronica (2). Dallo stesso campione inoculato su uova si esegue parallelamente l'estrazione e la purificazione dell'RNA, utilizzando il Trizol-Reagent (Invitrogen®, USA): una soluzione monofasica di fenolo e guanidinio isotiocianato, secondo la tecnica modificata descritta da Chomezynski e Sacchi (3). Ottenuto il nostro campione di RNA si procede alla retrotrascrizione utilizzando il ProSTAR™-kit (Stratagene®, USA), con l'aggiunta del primer XCE2- (Tabella 1) complementare al trascritto.

Tabella 1: Sequenza e posizione dei primers
Table 1: Sequence and position of primers

Nome	Sequenza (5'-3')	Posizione della Sequenza
XCE1+	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	729-249
XCE2-	CTCTATAAACACCCCTTACA	1170-1193

Il prodotto di retrotrascrizione viene utilizzato direttamente nel saggio di PCR previa l'aggiunta dei reagenti e del tampone necessario che fanno parte della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il primer "forward" XCE1+ e il primer "reverse" XCE2- che producono un frammento di 464bp (tab1) (1). La reazione avviene in un termociclatore automatizzato (Gene Cycler™, Bio-Rad®, USA) secondo il seguente profilo di amplificazione: 5 minuti a 94°C (hot start) seguito da 35 cicli costituiti da 3 step: 94°C per 30 secondi (denaturazione), 55°C per 30 secondi (ibridazione dei primers), 72°C per 1 minuto (estensione); al termine dei cicli 1 minuto a 72°C per eventuali estensioni. Il prodotto amplificato viene sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 7,5%,

colorazione con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2 e in figura 1.

Discussione

Questi primi dati hanno messo in evidenza una maggior sensibilità e specificità della PCR (42%) rispetto alla metodica classica (21%). Questo è da ricercarsi soprattutto nella capacità della PCR di riconoscere la presenza di poche copie di una particolare sequenza di DNA o RNA all'interno di un campione sospetto; quindi è possibile ottenere in tempi brevi alcuni microgrammi di DNA a partire da un numero molto ridotto di molecole iniziali. Inoltre non è necessario che il virus sia integro o replicativo, poiché si va a ricercare uno specifico *locus* genico del genoma virale interessato, evidenziandone così la presenza senza la necessità dell'isolamento. Spesso con l'inoculo su uova embrionate non si riesce ad isolare il virus, con le sue tipiche lesioni, per la presenza di infezioni secondarie, invece con la PCR questo problema non sussiste. Comunque con entrambe le metodiche per poter fare una corretta diagnosi virologica bisogna sempre tenere in considerazione l'età dell'animale, i segni clinici, le lesioni anatomico-patologiche e i diversi programmi vaccinali adottati. La PCR è una metodica apparentemente semplice e attualmente di "moda", ma in realtà soggetta a molte problematiche, legate

alla facilità della contaminazione, all'interpretazione del prodotto di amplificazione, alla perfetta conservazione del campione da analizzare (quando si amplifici a partire da RNA).

In conclusione, tutti questi concetti devono essere presi in considerazione per valutare l'opportunità di allestire un saggio di PCR, guidati dal principio che l'attendibilità della PCR in campo diagnostico non è legata soltanto alla corretta esecuzione e valutazione della singola reazione di amplificazione, ma è vincolata dal suo inserimento in una complessa ed articolata routine diagnostica.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il sig. Angelo Biondi, tecnico di laboratorio della Sezione IZSLER di Forlì.

Bibliografia

1. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). "Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions". *Avian Pathology*, 28,593-605.
2. Cavanagh D., Naqi S.A. (1997). "Infectious bronchitis". In *Disease of Poultry, 10th Edition*. (Calnek, B.W., ed.) pp. 511-26. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.
3. Chomezyski P., Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Analytic Biochemistry*, 162,156-9.
4. Wang X., Khan M.I., (1999). "Amultiplex PCR for Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus". *Molecular and Cellular Probes*, 13,1-7.

Tabella 2: Risultati ottenuti dallo studio in parallelo su uova embrionate SPF e PCR

Table 2: Results obtained with embryonated chicken eggs SPF and PCR

Metodo applicato	Positivo per IBV	Negativo per IBV	% positivi
Inoculo su uova embrionate SPF (3 passaggi)	34	26	21%
PCR	67	93	42%
Totale campioni esaminati= 160			

Figura 1: Risultati della ricerca virologica di IBV su campioni sospetti

Figure 1: Results of virological research

