

COMUNICAZIONE 9

CLONAZIONE E SEQUENZIAMENTO DELL'ORF 1 DEL VIRUS DELLA MALATTIA DEL BECCO E DELLE PENNE DEGLI PSITTACIDI (PBFVDV)

E. Bert, E. Grego, S. Cerruti Sola

Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

Parole chiave: virus della malattia del becco e delle penne (PBFVDV), pappagalli, clonazione, sequenze

Cloning and sequencing of the ORF1 of Psittacine Beak and Feather Disease Virus (PBFVDV)

Key Words: psittacine beak and feather disease, psittacine birds, polymerase chain reaction

Summary: In order to obtain more details about presence and diffusion of PBFVDV in Italy, we tested 7 sequences of the PBFVDV ORF1. We cloned and sequenced 7 PCR products of 717 pb. The positive birds were from 7 different species; 6 were born in Italy, 1 was born in New Guinea. The sequences analysis showed that PBFVDV has an high mutation rate. The PBFVDV viruses from Italian psittacines are similar while the virus from the New Guinea parrot is different.

Correspondence: Bert Elena, Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Sezione di Malattie infettive-Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci n°44, 10095 Grugliasco (Torino). E-mail: elenabert@yahoo.com

Introduzione

La malattia del becco e delle penne degli psittacidi (*Psittacine Beak and Feather Disease*) è una patologia ad eziologia virale, scoperta negli anni settanta in Australia e attualmente diffusa negli allevamenti di pappagalli in USA e Europa (2). La PBFVD è presente solo nei pappagalli e colpisce oltre 40 specie differenti (4). Il virus appartiene alla famiglia Circoviridae, ed ha un diametro di 14-20 nm. Il genoma completo di due isolati del PBFVDV è stato sequenziato e pubblicato. E' un virus a DNA, a catena singola e circolare di 1993 paia di basi (1,3). Tra le diverse tecniche diagnostiche, il metodo che offre maggior sensibilità e specificità per la diagnosi della PBFVD, secondo alcuni autori (2,4) è rappresentato dalla ricerca del DNA virale tramite la PCR (*polymerase chain reaction*).

In Italia la malattia del becco e delle penne è presente e la sua incidenza è stata stimata essere circa del 7% (6).

Con questo lavoro si è voluto ottenere dati più approfonditi sulla presenza del PBFVDV in Italia attraverso l'analisi di 7 sequenze di parte del genoma del virus, con l'obiettivo di mettere a punto, in un secondo tempo, un test ELISA per la ricerca del Circovirus dei pappagalli. Infatti un test sierologico sarebbe più pratico e più economico rispetto alla PCR.

Materiali e metodi

Campioni. Sono stati scelti 7 prodotti di amplificazione di campioni risultati positivi alla ricerca del Circovirus. La scelta è stata effettuata sia in base alla provenienza e alla specie degli uccelli da cui era derivato il DNA, sia in base alla qualità dell'amplificato. Il DNA proveniva da 6 pappagalli di differenti specie, nati in Italia in 6 diversi allevamenti, e da 1 pappagallo importato dalla Nuova Guinea.

Clonazione. Dopo purificazione degli amplificati con il metodo *QIAquick PCR purification Kit (Qiagen-USA)*, veniva eseguita la ligasi con il vettore pUC18 *SmaI/BAP* utilizzando il *Sure Clone Ligation kit (Pharmacia Biotech - USA)*. La trasformazione veniva fatta in cellule competenti (*E. coli*) che permettevano di effettuare lo *screening* "bianco-blu" delle colonie in presenza di XGAL e IPTG.

Sequenziamento. Venivano verificate le colonie positive con una PCR e, dopo estrazione del DNA da

plasmide, veniva effettuata la reazione di *cycle sequencing* nel *Termal Cycler Cetus 2400 (Abiprism-USA)*. Dopo purificazione della reazione e denaturazione, si eseguiva il sequenziamento nel sequenziatore *ABI Prism 310 (USA)*. *Analisi delle sequenze.* Dopo aver verificato e corretto le sequenze con il programma *Chromas2*, si analizzavano con *ClustalX*, e *Mega* e la filogenesi veniva fatta con il metodo *Neighbor Joining*, e con la matrice *Tamura-nei*. Veniva infine eseguita una verifica con il test *Bootstrap*.

Risultati e Discussione

Dai 7 prodotti di amplificazione iniziali, è stato possibile ottenere le sequenze dell'ORF1 del PBFVDV, che consistevano di 717 paia di basi. Le sequenze ottenute provenivano da campioni di sangue prelevati nei soggetti descritti in tabella 1.

Tabella 1: Specie da cui sono stati prelevati i campioni di sangue

Table 1: Species from which blood samples were taken

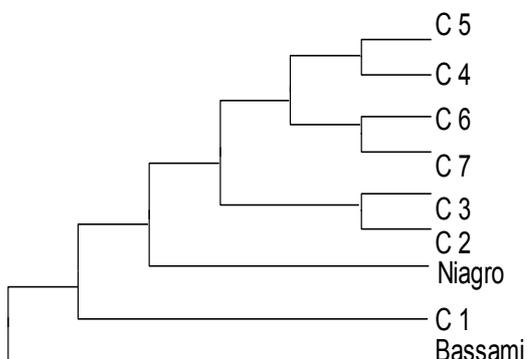
Specie	Origine	Clone
<i>Cacatua ophthalmica</i>	Nuova Guinea	C 1
<i>Agapornis spp.</i>	Allevam. 1	C 2
<i>Amazona albifrons</i>	Allevam. 2	C 3
<i>Cacatua sulphurea</i>	Allevam. 3	C 4
<i>Cacatua sulphurea</i>	Allevam. 4	C 5
<i>Poicephalus rufiventris</i>	Allevam. 5	C 6
<i>Melopsittacus undulatus</i>	Allevam. 6	C 7

Le sequenze di riferimento scelte erano due: una pubblicata da Niagro (3), di un virus proveniente da un pappagallo nato in cattività in USA e l'altra pubblicata da Bassami (1), sequenza di DNA virale estratto da un pappagallo selvatico dell'Australia. L'analisi delle sequenze ha permesso di individuare una notevole variabilità del tratto di genoma dei Circovirus studiati. E' molto alto il tasso di mutazioni, molte delle quali

sono non sinonime e determinano quindi variazioni nella composizione degli aminoacidi.

Figura 1: Filogenesi dei Circovirus della PBF/D sequenziati in Italia

Figure 1: Phylogenetic tree of PFB/D Circovirus isolated in Italy



L'analisi dell'albero filogenetico ha messo in evidenza una netta distanza tra i cloni derivanti da campioni di uccelli nati in cattività e tra quelli di uccelli selvatici. Come si vede in figura 1, il clone 1, originario della Nuova Guinea, è collegato a quello di riferimento proveniente dall'Australia. La distanza tra il clone australiano e gli altri mette in evidenza che si tratti di un ceppo vecchio da cui derivano gli altri, ciò confermerebbe l'ipotesi che i Circovirus siano originari dell'Australia e si siano successivamente diffusi in USA e Europa, con il commercio dei pappagalli.

Il raggruppamento dei ceppi provenienti dai soggetti nati in cattività in Italia dimostra che questi sono più vicini al ceppo di riferimento americano, proveniente anche questo da un soggetto nato in cattività. Non ci sono significative differenze legate alla specie di pappagallo, come avevano già evidenziato Bassami (1) e Ypelaar (5). I ceppi italiani sono tutti vicini tra loro. Come si può osservare, i cloni sono raggruppati a coppie, ma non si conosce una spiegazione di ciò, poiché i campioni provengono da allevamenti diversi e geograficamente distanti tra loro. Si sa che nella pratica dell'allevamento dei pappagalli, avvengono spostamenti di uccelli da un allevamento all'altro,

questo favorirebbe la diffusione del virus e spiegherebbe perché alcuni ceppi sono vicini tra loro.

L'elevata variabilità del virus mette in guardia su eventuali problemi che potrebbero verificarsi in futuro: come accade nella diagnosi di altre patologie ad eziologia virale, tecniche diagnostiche quali l'ELISA messe a punto su un determinato ceppo virale possono essere inefficaci qualora il ceppo virale sia differente. È interessante osservare come uccelli importati da Paesi in cui la patologia è endemica, possano portare con sé ceppi del virus diversi da quelli già presenti in Italia, così come è avvenuto per il campione C1. Questo è un altro elemento che dovrà essere considerato nella messa a punto di eventuali metodi diagnostici. Sarà quindi necessario proseguire nello studio delle sequenze dei Circovirus degli psittacidi rilevati in Italia, per poter lavorare su nuove tecniche diagnostiche. Sarebbe inoltre auspicabile la creazione di veri e propri centri di quarantena degli uccelli importati, dove effettuare controlli sanitari al fine di prevenire la diffusione del Circovirus in allevamenti italiani.

Bibliografia

1. Bassami M.R., Berryman D., Wilcox G.E., Raidal S.R. (1998). Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses and chicken anaemia virus. *Virology*, 249, 453-459.
2. Dalhausen M.S., Radabaugh M.S., (1997). Update on Psittacine Beak and Feather Disease and Avian Polyomavirus – epidemiology and diagnostics. *Proceedings of the MASAAV Conference*, 51-57.
3. Niagro F.D., Forsthoefel A.N., Lawther R.P., Kamalanathan L., Ritchie B.W., Latimer K.S., Lukert P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediate between geminiviruses and plant circoviruses. *Arch. Of Virology*, 143, 1723-1744.
4. Todd D., (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology*, 29, 373-394.
5. Ypelaar I., Bassami M.R., Wilcox G.E., Raidal S.R. (1999). A universal polymerase chain reaction for the detection of psittacine beak and feather disease virus. *Veterinary Microbiology*, 68:141-148.
6. Bert E., Cerruti Sola S. (2001). Indagine sulla presenza della Malattia del becco e delle penne degli psittacidi (PBF/D) in allevamenti italiani. Congresso SIPA, Forlì, questo volume.