

COMUNICAZIONE 25

NESTED-PCR PER SIEROTIPIZZAZIONE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

F. PAGANELLI, P. MASSI, G. TOSI, L. FIORENTINI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: virus della bronchite infettiva aviare, sierotipizzazione, nested-PCR, primers.

Nested-PCR for identification serotype of infectious bronchitis virus

Key words: infectious bronchitis virus, serotype differentiation, nested-PCR, primers.

Summary: Infectious bronchitis virus (IBV), a member of the Coronaviridae, is a positive sense, single-stranded RNA virus with a genome size about 27.6 kilobase. IBV causes a highly contagious respiratory infection in chickens. A rapid, highly sensitive and specific method is needed in the differential diagnosis of infections of different serotypes. A nested-PCR method was developed and optimized to detect M41, D274, 793/B e B1648 serotypes of IBV. Nested-PCR analysis using the oligonucleotides specific for sequences within the S2 region of spike (S) gene.

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 aviare (IBV) è una malattia sistemica del pollo, altamente contagiosa, caratterizzata da sindrome respiratoria, cali di deposizione, peggioramento della qualità del guscio e lesioni renali. IBV è considerato il prototipo della famiglia *Coronaviridae*, ha un genoma RNA a singolo filamento costituito da 27600 nucleotidi, che codificano quattro proteine strutturali: la proteina S, le proteine della membrana, M glicosilata e una piccola proteina E, e la proteina N fosforilata del nucleocapside. La proteina S è suddivisa in due subunità polipeptidiche, S1 (525 aminoacidi) che gioca il ruolo maggiore nell'immunità e S2 (625 aminoacidi) che serve da base del peplomero e da ancoraggio alla membrana. La proteina S è risultata estremamente variabile, specie la subunità S1. Numerosi sierotipi noti differiscono, infatti, tra loro per più del 20% dei loro aminoacidi di questa proteina. Ad esempio il sierotipo 793/B nella subunità S1 si differenzia del 20-25% rispetto agli altri sierotipi. Con la *polymerase chain reaction* (PCR) si utilizza proprio la sequenza nucleotidica della subunità S1 per identificare IBV e anche per distinguere alcuni sierotipi noti. Con questo lavoro si è cercato di tipizzare, con tecniche di biologia molecolare, 15 ceppi di IBV identificati nel corso del 2001.

Materiali e metodi

Identificazione del virus

Il campione di partenza, in base alle lesioni presenti nell'animale, è costituito da raschiato tracheale, polmone, rene, tonsille cecali e ovidotto; dopo una omogeneizzazione con PBS antibiotato, viene centrifugato a 3,000 x g e il sovrantante viene utilizzato per l'estrazione e 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 (2). Ottenuto l'RNA si procede alla retrotrascrizione (RT) utilizzando il ProSTAR™ -Kit (Stratagene®, USA), con l'aggiunta del primer XCE2- (Tabella 1) complementare al trascritto. Il prodotto di retrotrascrizione viene utilizzato direttamente nel saggio di PCR eseguito secondo il protocollo della Platinum TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione i primers XCE1+ e XCE2- che producono un frammento di 464 bp (Tabella 1) (1), identificativo di

IBV. La reazione avviene 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 (*annealing*), 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 1,7% con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

Nested-PCR

Il frammento di 464bp viene utilizzato per una *nested-PCR* con l'aggiunta del primer "reverse" XCE3- e dei primers "forward" BCE1+, DCE1+ e MCE1+ specifici rispettivamente per il sierotipo 793/B, D274 e M41 (Tabella1) (1).

Ogni sierotipo presenta un cDNA di lunghezza specifica: il 793/B corrisponde ha un frammento di 154bp, il D274 di 217bp mentre l'M41 di 295bp. Il cDNA, prodotto con l'RT, va incontro ad un'altra PCR eseguita con i primers S1UNI2+ e XCE2-, seguita da una *nested-PCR* con i primers XCE3- e B1648+ specifici per il sierotipo B1648, caratterizzato da un frammento di 682bp (Tabella 1) (3). La *nested-PCR* viene eseguita secondo lo stesso protocollo della prima PCR e i prodotti ottenuti vengono sempre analizzati grazie a una corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,7%.

Risultati

I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2.

Discussione

L'IBV è una vera infezione sistemica e, nonostante l'esteso uso dei vaccini rappresenta ancora uno dei principali problemi sanitari dell'allevamento avicolo. Questo è dovuto alla sua diffusione mondiale, all'estrema variabilità del virus, dovuta in gran parte alla ricombinazione genica e alla pressione selettiva dei vaccini non sempre completamente efficaci. L'indagine epidemiologica deve essere in grado di valutare la presenza dell'infezione mediante l'isolamento o l'identificazione del virus, la sua diffusione (mediante monitoraggi sierologici), ma soprattutto la comparsa di varianti e nuovi sierotipi.

Lo studio dei 15 ceppi di IBV identificati con la RT-PCR, seguiti dalla sierotipizzazione con la *nested-PCR* ha rilevato una elevata prevalenza del sierotipo 793/B. E' importante evidenziare che tutti i gruppi esaminati sono stati vaccinati solo nei riguardi del sierotipo M41, tranne un campione che è stato

vaccinato anche per il sierotipo 793/B. Con la metodica di PCR è possibile identificare il ceppo vaccinale anche dopo 4 settimane dalla vaccinazione, quindi non si riesce a discriminare se si tratta di un ceppo IBV di campo oppure no (1). Questa difficoltà sottolinea maggiormente la necessità che gli esami di laboratorio siano sostenuti da una valutazione dei dati anamnestici, con particolare riguardo al piano vaccinale adottato e al quadro anatomopatologico. Sicuramente la *nested*-PCR è un metodo più specifico e sensibile per la sierotipizzazione di IBV rispetto all'inibizione dell'emoagglutinazione che presenta una cross-reattività anticorpale e quindi una difficoltà nell'interpretazione dei dati.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il personale tecnico della Sezione IZSLER di Forlì.

Tabella 1: Posizione e sequenza dei primers.

Table 1: Position and sequence of primers.

Primer	Sequenza (5'-3')	Gene	Posizione nel gene S
XCE2-	CTCTATAAACACCCTTACA	S1	1168-1193
XCE1+	CACTGGTAATTTTCAGATGG	S1	728-749
XCE3-	CAGATTGCTTACAACCACC	S1	1093-111
BCE1+	AGTAGTTTTGTGTATAAACCA	S1	958-978
DCE1+	ATACAATTATATCAAACCAGC	S1	895-915
MCE1+	AATACTACTTTTACGTTACAC	S1	817-837
S2UNI2+	CCCAATTTGAAAACCTGAACA	S1	31-47
B1648+	ACGGAAGGTGAATCATACC	S1	415-433

Tabella 2: Casi esaminati.

Table 2: IBV outbreaks examined.

Classe di animali	Età animale	Piano vaccinale	Sierotipo IBV
BROILER	17gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER		H120 a 1gg	M41
BROILER	45gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	33gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
POLLASTRE	38gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	23gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B + M41
BROILER	28gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B + M41
BROILER	37gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	50gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	49gg.	H120 a 1gg.+ inattivato	793/B
BROILER	40gg.	H120 a 1gg	793/B
CAPPONI	80gg.	H120 a 1gg	793/B
POLLASTRE	45gg.	H120 a 1gg	M41
BROILER	58gg.	H120 a 18gg. + 793/B a 32gg.	793/B + M41
BROILER	47gg.	H120 a 1gg	793/B