

COMUNICAZIONE 11

PCR NELLA DIAGNOSI IN VIVO DELL'INFEZIONE DA CIRCOVIRUS NEL PICCIONE

M.P. Franciosini, E. Fringuelli, O. Tharuni, G. Guelfi, G. Asdrubali

Dipartimento di Scienze Biopatologiche veterinarie. Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia

Parole chiave: circovirus, piccione, PCR, sangue, contenuto intestinale

A PCR based method to detect Pigeon circovirus infection in vivo

Key words: Circovirus, pigeons, PCR, blood, intestinal content

Summary: It is here described a standard PCR protocol for the in vivo diagnosis of pigeon circovirus. Samples of sera and intestinal contents of pigeons belonging to different age groups, all originating from a intensive unit located in Centre Italy were examined. For running the PCR method we used a couple of primers that amplifies a segment of 518 bp. By carrying out this method we found positive 15 sera samples and 12 intestinal contents, out of 100 globally examined. For a routine use of PCR it is suggested the use of universal primers set up after having compared the sequence of a number of strains isolated from geographically different areas.

Correspondence: M.P. Franciosini. Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sezione di Patologia e Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Perugia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Via S. Costanzo, 4- 06100, Perugia. Email mpfra@unipg.it

Introduzione

La diagnosi di infezione da Circovirus nel piccione risulta problematica dal momento che non è possibile la coltivazione del virus e non sono disponibili antisieri specifici per la ricerca dell'antigene; pertanto l'esame istologico e l'indagine alla M.E a contrasto negativo fino ad ora sono state le procedure diagnostiche più applicate (4,1). Il recente clonaggio e la determinazione della sequenza nucleotidica del genoma di PiCV (5) ha comportato lo sviluppo di nuovi strumenti per la diagnosi di infezione da Circovirus nei piccioni, quali il test di PCR e di DBH (test di ibridazione dot blot) (6). La maggior parte delle procedure descritte si riferisce ad indagini condotte post mortem; solo recentemente, infatti, Hatterman et al. (3) hanno messo a punto un test di DBH, eseguito su campioni di sangue, che consente una diagnosi in vivo delle infezioni da Circovirus.

L'obiettivo principale di tale lavoro è stato quello di eseguire il test di PCR a partire da campioni costituiti da sangue e da contenuto intestinale, al fine di poter valutare la possibile applicazione di questa procedura per indagini diagnostiche ed epidemiologiche.

Materiali e Metodi

Le ricerche sono state condotte su 100 piccioni, di età compresa tra 1 settimana e 42 gg, prelevati a random da un allevamento del Centro Italia. Previo salasso, i soggetti sono stati soppressi, sottoposti ad esame necroscopico e sono stati raccolti il contenuto intestinale, timo e borsa di Fabrizio. Per il test di PCR, il contenuto intestinale e il sangue sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'uso, mentre borsa di Fabrizio e timo sono stati fissati in formalina per indagini istologiche. Il DNA è stato estratto da tutti i campioni utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit e il QIAamp DNA stool Mini Kit (Qiagen) seguendo il protocollo standard.

Per la reazione di PCR è stata usata una coppia di primer che amplifica un segmento di 518 bp localizzato nella regione genomica all'estremità 3' degli ORF V1 e C1 del virus (primer senso: 5'-CGT GCG TGA TAA TAG TG-3'. Primer antisenso: 5'-TGT ATT ATG AAT GTG AAG TGA CC3') (6). Il DNA estratto è stato sottoposto ad amplificazione genica utilizzando la PCR Master Mix (MBI Fermentas). Il protocollo di PCR comprende i seguenti cicli: una fase

di predenaturazione a 94°C per 1' 30" e 35 cicli a 94°C per 15", 60°C per 30" e 72°C per 45" con una estensione finale a 72°C per 10'. Oltre al controllo negativo, è stato effettuato un controllo positivo con DNA plasmidico ricombinante contenente il genoma del circovirus (isolato 9030) ed un controllo per monitorare il DNA di partenza mediante housekeeping 18S, bp315 (Fig.1 e 2). L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante applicazione del test χ^2 .

Risultati

Le lesioni macro e microscopiche a carico degli organi linfatici primari, caratterizzate rispettivamente da atrofia e deplezione linfocitaria, aumentano in modo significativo ($P < 0,001$) con l'età fino ad arrivare al 100% nei soggetti da rimonta esaminati in VI settimana (tab.1). In IV settimana si osserva una positività del 30% per quanto riguarda il sangue e del 20% per il contenuto intestinale, mentre relativamente ai piccioni di 6 settimane la percentuale di soggetti positivi è pari al 40% per il sangue e al 30% per il contenuto intestinale (tab.2) Il test del χ^2 non evidenzia differenze significative fra i campioni all'interno della medesima settimana. Lo stesso test, inoltre, evidenzia un significativo aumento di positività nel tempo dei campioni saggiati ($P < 0,01$ per il sangue e $P < 0,02$ per il contenuto intestinale).

Considerazioni e conclusioni

Come riscontrato nel corso di precedenti studi (2) le lesioni macro e microscopiche prodotte dall'azione del circovirus aumentano con l'età, giustificando una trasmissione a carattere prevalentemente orizzontale. Nella maggior parte dei casi non sono stati osservati sintomi a conferma del fatto che l'infezione è spesso subclinica (4); a volte sono state riscontrate lesioni anatomopatologiche riportabili all'azione di *Salmonella spp.*, *E.coli* e *Trichomonas*. L'osservazione microscopica delle sezioni di timo e borsa di Fabrizio non ha permesso di rilevare le caratteristiche inclusioni basofile citoplasmatiche anche in presenza di marcata deplezione linfocitaria, osservabili generalmente in stati avanzati dell'infezione. L'assenza sempre più frequente di questo reperto istopatologico potrebbe essere giustificata dall'intervento di varianti del PiCV caratterizzate da una azione patogena diversa (6). I risultati ottenuti relativi al test di PCR consentono di trarre alcune

considerazioni; in primo luogo va sottolineato che la positività dei campioni aumenta in modo statisticamente significativo con l'età. Inoltre, tale metodica, eseguita su campioni di sangue, ha evidenziato la sua possibile applicazione a scopo diagnostico nell'animale in vita. La presenza del virus nel contenuto intestinale, in particolare in soggetti di età superiore alla IV settimana, conferma ulteriormente una trasmissione per contatto diretto, in cui le feci nelle voliere potrebbero giocare un ruolo di primaria importanza e costituire un potenziale materiale di ricerca del virus tramite PCR. E' evidente tuttavia che, nonostante l'estrema sensibilità e specificità che caratterizza questa procedura, alcuni campioni provenienti da soggetti con marcata deplezione linfocitaria sono risultati negativi. Ciò conferma il fatto che un limite all'applicazione del test di PCR, come strumento di screening epidemiologico, potrebbe essere costituito dall'esistenza di varianti di PiCV (6). Pertanto i risultati negativi ottenuti in alcuni casi possono essere dovuti al set di primer utilizzato. Di conseguenza l'impiego del test di PCR per la diagnostica e l'epidemiologia delle infezioni da Circovirus risulta sicuramente subordinato ad un sequenziamento dei virus isolati da differenti aree geografiche, al fine di individuare una regione conservata del virus ove disegnare primer universali

che consentano l'applicazione di tale metodica su larga scala.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. D. Todd, Department of Agriculture and Rural Development for Northern Ireland, Veterinary Sciences Division, per il plasmide ricombinante (isolato 9030) fornito.

Bibliografia

1. Coletti M., Franciosini M.P., Asdrubali G., Passamonti F. 2000. Atrophy of the primary lymphoid organs of meat pigeons in Italy associated with circovirus-like particles in the bursa of Fabricius. *Avian Dis.* 44, 454-459
2. Franciosini M.P., Lavazza A., Parillo F., Tacconi G. 2002. Risultati preliminari su alcuni aspetti patogenetici dell'infezione da Circovirus nei piccioni da carne. *L.An.Pev.* 6 83-84
3. Hatterman K., Soike D., Grund C., Mankertz A. 2002. A method to diagnose Pigeon circovirus infection in vivo. *J. Virol. Meth.* 104, 55-58
4. Pare J.A., Brash M.L., Hunter B., Hampson R.J. 1999. Observations on pigeon circovirus infection in ontario. *Can. Vet. J.* 40:659-662
5. Todd D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. 2001. Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 286, 354-362
6. Todd D., Duchatel J.P., Weston J.H., Ball N.W., Borghmans B.J., Moffett D.A., Smyth J.A. 2002. Evaluation of polymerase chain reaction and dot blot hybridisation tests in the diagnosis of pigeon circovirus infection *Vet.Micr.* 89, 1-16

Tabella 1. Lesioni anatomiche e istologiche del timo e della borsa di Fabrizio riscontrate nelle varie fasce di età
Table 1. Anatomical and histological lesions of thymus and bursa of Fabricius in pigeons of different age

	I settimana		II settimana		III settimana		IV settimana		VI settimana	
	Timo	Borsa	Timo	Borsa	Timo	Borsa	Timo	Borsa	Timo	Borsa
Lesioni anatomiche (%)	0/20	0/20	2/20	2/20	9/20	12/20	18/20	12/20	20/20	20/20
	-	-	(10%)	(10%)	(45%)	(60%)	(90%)	(60%)	(100%)	(100%)
Lesioni istologiche (%)	0/20	0/20	2/20	2/20	8/20	12/20	10/20	12/20	20/20	20/20
	-	-	(10%)	(10%)	(40%)	(60%)	(50%)	(60%)	(100%)	(100%)

Tabella 2. Campioni di sangue e di contenuto intestinale, prelevati da soggetti di varie fasce di età, risultati positivi al test di PCR.

Table 2. PiCV-DNA detection by PCR in blood and intestinal samples from pigeons of different age

	I settimana		II settimana		III settimana		IV settimana		VI settimana	
	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.	Sangue	C. intest.
PCR (%)	1/20	1/20	0/20	0/20	0/20	1/20	6/20	4/20	8/20	6/20
	(5%)	(5%)	-	-	-	(5%)	(30%)	(20%)	(40%)	(30%)

Figura 1. PCR per il rilievo di PiCV. Lane 1 controllo negativo di PCR, lane 2 Ladder 100bp, lane 3 controllo positivo, lane 4-5-6 campioni negativi di sangue

Figure 1. PiCV-specific PCR. Lane 1 PCR negative control, lane 2 Ladder 100bp, lane 3 positive control, lane 4, 5, 6 negative blood samples

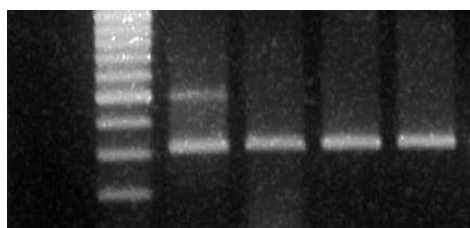


Figura 2. PCR per il rilievo di PiCV. Lane 1 Ladder 100bp, lane 2-3 campioni positivi sangue, lane 4 campione negativo sangue, lane 5 campione positivo feci, lane 6 controllo negativo di PCR

Figure 2. PiCV-specific PCR. Lane 1 Ladder 100bp, lane 2-3 positive blood samples, lane 4 negative blood samples, lane 5 positive intestinal sample, lane 6 PCR negative control.

