

## COMUNICAZIONE 15

### POLYMERASE CHAIN REACTION E COLTURE CELLULARI: DUE TECNICHE DIAGNOSTICHE A CONFRONTO PER L'IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA AVIARE

F. Paganelli, L. Fiorentini, R. Leonelli

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

Parole chiave: virus dell'anemia infettiva del pollo, polymerase chain reaction, MDCC-MSB1

#### Polymerase chain reaction and cell line: two diagnostic methods in comparison to identify the chicken anaemia virus

Key words: chicken anaemia virus, polymerase chain reaction, MDCC-MSB1

Summary: Chicken infection anaemia (CIA) is a viral disease of chicken and causes economic losses because of death in young chicks, growth retardation, secondary infections. The diagnosis of CIAV has typically been carried out by serological procedures and isolation of the virus. CIAV DNA was detected by polymerase chain reaction (PCR), and the results of CIAV detection by PCR and by MDCC-MSB1 were compared.

Correspondence: Francesca Paganelli, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Sezione diagnostica di Forlì- Via Marchini n°1- 47100 Forlì. E-mail [forli@bs.izs.it](mailto:forli@bs.izs.it)

#### Introduzione

Il virus dell'anemia infettiva del pollo (CIAV) è l'agente causale dell'anemia infettiva aviaria (CIA) che venne descritta per la prima volta da Yuasa *et al.* nel 1979 (4). Si tratta di una malattia virale trasmissibile del pollo il cui agente eziologico è ubiquitario e molto resistente nell'ambiente. Nell'animale determina un'anemia aplastica generalizzata con prevalente atrofia transitoria linfoide T e conseguente depressione della risposta immunitaria cellulomediata. L'infezione da CIAV avviene sia per trasmissione verticale che orizzontale. In diagnostica viene usata prevalentemente la linea cellulare MDCC-MSB1 (linfoma splenico) per identificare ed isolare il virus CIAV. Nel 2002 abbiamo dimostrato la possibilità di utilizzare la *polymerase chain reaction* (PCR) per identificare il virus dell'anemia infettiva da sospensioni cellulari risultate positive sulla linea cellulare MDCC-MSB1 (3). Da gennaio 2003 abbiamo iniziato ad applicare la tecnica molecolare nella routine diagnostica sempre in parallelo con l'esame tradizionale su colture cellulari. In questo modo abbiamo potuto verificare l'utilizzo della tecnica di PCR per l'identificazione del virus.

#### Materiali e metodi

##### Infezione su colture cellulari

L'inoculo è stato allestito a partire da midollo femorale, fegato e milza. Il materiale di partenza è stato omogenato con PBS antibiotato, centrifugato a 3,000 x g e filtrato a 450 nm. Sono state utilizzate colture cellulari in sospensione MDCC-MSB1, che richiedono il *medium* RPMI-1640 addizionato con il 8% di siero fetale bovino e il 7% di *tryptose phosphate broth* (TPB). Le colture cellulari infettate sono state incubate a 39°C, CO<sub>2</sub> 5%. Ogni 48 ore è stata effettuata una subcoltura fino a 10 passaggi. La positività è rappresentata da un effetto citopatico ben visibile al microscopio ottico: mortalità cellulare, cellule globose e deformi, disaggregazione della cromatina con occasionale presenza di vacuoli nucleari (3).

##### Estrazione del DNA e PCR

Lo stesso campione inoculato sulle MDCC-MSB1 è stato utilizzato per la ricerca del genoma virale. L'estrazione del DNA virale dal materiale patologico è stata eseguita secondo il protocollo QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-Hialden®, Germany). Il prodotto di estrazione è stato utilizzato direttamente nel saggio di

PCR previa l'aggiunta dei reagenti che fanno parte della PlatinumTaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione i *primers* CA1N+ e CA2N- che producono un frammento di 480 bp (tab.1) (1). La reazione di PCR avviene secondo il seguente profilo: 5 minuti a 94°C, seguiti da 35 cicli costituiti da 3 *step*: 94°C per 30 secondi, 60°C per 30 secondi, 72°C per 30 secondi; al termine dei cicli 5 minuti a 72°C per eventuali estensioni. Il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,5%, con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV. In ogni reazione era presente un campione di controllo positivo e negativo. La specificità dei prodotti di PCR è stata confermata con l'utilizzo degli enzimi di restrizione PstI e SacI (2).

Tabella 1: Sequenza dei primers.

Table 1: Sequence of primers.

PRIMERS	SEQUENZA NUCLEOTIDICA
CA1N+	5'-CCAAGAAGATACTCCACCCG-3'
CA2N-	5'-TACGATACCGCGTGCTCCTC-3'

#### Risultati

Da gennaio 2003 a luglio 2003 sono stati analizzati 44 casi clinici che presentavano una sintomatologia ascrivibile a CIAV. E' stata eseguita la ricerca del virus sia su colture cellulari MDCC-MSB1 sia con la tecnica di PCR. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 2 e nella figura 1.

Tabella 2: Risultati

Table 2: Results

CAMPIONI	PCR	MDCC-MSB1
POSITIVO PER CIAV (%)	18 (40,9)	4 (9)
NEGATIVO PER CIAV (%)	26 (59)	40 (90,9)

#### Discussione

I risultati ottenuti dimostrano un'elevata sensibilità e specificità della tecnica di PCR per l'identificazione del CIAV. Sono risultati positivi 18 campioni su un totale di 44 tramite la tecnica di biologia molecolare, contro i 4

campioni rilevati con le colture cellulari. E' necessario sottolineare le diverse caratteristiche dei due metodi considerati. Con le colture cellulari si isola il virus con capacità replicative, mentre con la tecnica di PCR è possibile solo identificare la presenza del genoma virale, non è possibile valutare se il virus è vivo ed integro, in fase replicativa o dormiente. Quindi per studi epidemiologici e sperimentali è necessario ricorrere all'utilizzo della linea cellulare MDCC-MSB1 che permette di isolare il virus in esame.

Ai fini diagnostici è importante considerare le caratteristiche di ogni tecnica utilizzata in modo da rapportarle ai dati anamnestici e al quadro anatomopatologico del caso clinico in esame.

Non bisogna dimenticare la rapidità di esecuzione della tecnica di PCR rispetto all'utilizzo delle colture cellulari: 2 giorni contro i 15-20 giorni necessari per le MDCC-MSB1.

Inoltre per svelare infezioni subcliniche la PCR risulta il metodo noto più sensibile e rapido.

#### Ringraziamenti

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

#### Bibliografia

1. Imai K., Mase M., Yamaguchi S., Yausa N., Nakamura K. (1998). "Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissue by polymerase chain reaction". *Research in Veterinary Science*, 64, 205-208.
2. Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D., Muller H. (2001). "Genetic determinants of in vitro growth of chicken anaemia virus" in: *II International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Infectious*

Anaemia, Rauscholzhause, Germany, 16-20 June 2001, 130-143.

3. Paganelli F., Massi P., Tosi G. (2002). "Identificazione del virus dell'anemia infettiva del pollo con la polymerase chain reaction". *Large Animals Review*, anno 8, numero 6, bimestrale 2002.
4. Yuasa N., Taniguchi T., Yoshida I. (1979). "Isolation and some characteristics of an agent inducing anaemia in chicks". *Avian Diseases*, 23, 366-385.

Figura 1: Risultati

Figure 1: Results

