

8) IDENTIFICAZIONE E TIPIZZAZIONE DEL PNEUMOVIRUS AVIARE TRAMITE TECNICHE MOLECOLARI

Francesca Paganelli¹, Laura Fiorentini¹, Giovanni Tosi¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Corresponding author: Dr. Francesca Paganelli. Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì. Via Marchini 1, 47100 Forlì, Italy- Tel. & Fax +39 0543 721533
Email: forli@bs.izs.it

Riassunto

Il Pneumovirus aviare (APV) è l'agente eziologico di due importanti malattie quali la Rinotracheite Infettiva del tacchino (TRT) e la Malattia della testa gonfia ("Swollen Head Syndrome", SHS). Diversi sono gli strumenti diagnostici attualmente disponibili e tra questi, l'applicazione di una RT-PCR per l'identificazione del virus, seguita da una nested-PCR per la tipizzazione del sottotipo.

Parole chiave: Pneumovirus aviare, RT-PCR, nested-PCR.

Introduzione

La Rinotracheite infettiva del tacchino (TRT) e la Swollen head syndrome (SHS) sono malattie contagiose, rispettivamente del tacchino e del pollo, con carattere prevalentemente respiratorio, frequentemente soggette a complicazioni batteriche secondarie, causate da un virus del genere *Pneumovirus* (APV) (Jane et al., 2002).

Nel tacchino la malattia è caratterizzata da starnuti, rantoli, scolo nasale, congiuntivite e lacrimazione, sinusite ed edema sottomandibolare, grave depressione. Negli adulti si osserva calo della deposizione fino al 70%, respiro a becco aperto, a volte malattia inapparente. Morbilità bassa così come la mortalità salvo complicazioni batteriche spesso presenti. (Pascucci, 1996)

In base al sequenziamento del gene G ed alle caratteristiche sierologiche sono stati distinti 4 sottotipi di APV (A, B, C, D). I sottotipi A e B, diffusi in Europa, differiscono sulla base della sequenza nucleotidica del gene G. Il sottotipo C, segnalato negli Stati Uniti d'America, presenta invece differenze genomiche e sierologiche più evidenti, come anche il sottotipo D (Juhász et al., 1994).

La diagnosi si basa sull'osservazione dei sintomi clinici (non sempre apprezzabili) e delle lesioni anatomopatologiche (non patognomiche). Risulta quindi di supporto fondamentale la diagnosi di laboratorio che si basa sull'isolamento ed identificazione del virus su anelli tracheali di tacchino (valutazione della ciliostasi quindi identificazione tramite immunofluorescenza, virusneutralizzazione, microscopia elettronica). Il virus può essere adattato a colture primarie di fegato di pollo (FEP), nei quali si osserva effetto citopatico sinciziale. Per le indagini sierologiche viene impiegata di routine un' ELISA utile sia per monitoraggio che per la diagnosi.

In base alle differenze nucleotidiche del gene G è possibile identificare il genoma virale APV con l'utilizzo della RT-PCR ed in seguito con una nested-PCR si riesce a discriminare tra sottotipo A e B.

Materiali e metodi

Estrazione RNA e RT-PCR

La prova in PCR è stata allestita a partire da campioni patologici prelevati in sede autoptica (trachee e tamponi tracheali), di pollo e tacchino. E' stata inoltre eseguita l'estrazione del genoma virale dai tre vaccini vivi attenuati utilizzati in Italia: Poulvac® TRT (Fort Dodge, Weesp, Holland), Rinovax® (Merial, Milano, Italy), Nobilis®TRT (Intervet, Boxmeer, Holland) a scopo di verifica.

Per l'estrazione dell'RNA è stato utilizzato il kit RNeasy® MiniKit (Qiagen, Valencia, CA) seguendo il protocollo allegato.

Ottenuto l'RNA si procede alla retrotrascrizione (RT) utilizzando il Prostar™ Kit (Stratagene®, USA), con l'aggiunta del primer "reverse" G6- complementare al trascritto (Cavanagh et al., 1999).

Il prodotto di retrotrascrizione viene utilizzato direttamente nel saggio di PCR eseguito secondo il protocollo della Accuprime TaqPCRx DNA Polymerase (Invitrogen®, USA).

Fungono da innesco alla reazione i primers G6- e G1+ che producono un frammento di 444bp, identificativo di APV (Cavanagh et al., 1999). La reazione avviene secondo il seguente profilo di amplificazione: 2 minuti a 94°C (hot start) seguito da 30 cicli costituiti da 3 step: 94°C per 1 minuto (denaturazione), 50°C per 1 minuto (annealing), 72°C per 2 minuti (estensione); al termine dei cicli 2 minuti a 72°C per eventuali estensioni. In ogni reazione sono presenti sia il controllo positivo che negativo.

Il prodotto amplificato viene sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% con bromuro di etidio e visualizzazione mediante transilluminatore a raggi UV.

Nested-PCR

Ottenuta la positività per APV è possibile discriminare il sottotipo A e B in base alle differenze presenti nella sequenza del gene G.

L'amplificato di 444 bp viene sottoposto a una nested-PCR utilizzando un primer "reverse" G5- comune per entrambi i sierotipi, e 2 primers "forward", uno per il sottotipo A (G8 +A) che amplifica un frammento di 268 bp e l'altro primer specifico per il sottotipo B (G9 +B) che produce un cDNA di 316 bp. I prodotti amplificati, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1,7%, sono stati visualizzati mediante colorazione con bromuro di etidio tramite transilluminatore a UV (Cavanagh et al., 1999).

Risultati e discussione

I tre vaccini analizzati sono risultati rispettivamente: Poulvac® TRT e Nobilis® TRT sottotipo A, Rinovax® sottotipo B.

Da settembre 2003 a giugno 2004 sono stati eseguiti 122 ricerche per APV da tacchino e pollo, di cui 5, da tacchino, sono risultate positive per APV. Successivamente si è eseguita una nested-PCR che ha rivelato 3 campioni positivi per il sottotipo B e 2 per il sottotipo A (tab 2).

Conclusioni

La diagnosi clinica di TRT non è semplice, vista la mancanza di specifiche lesioni patognomoniche.

L'isolamento virale è difficoltoso e dispendioso.

Sicuramente l'RT-PCR si presenta come la tecnica più rapida e sensibile per l'identificazione del genoma virale. In 48 ore è possibile avere il risultato dell'indagine di laboratorio, quindi si presta bene sia a scopo diagnostico di supporto al quadro anamnestico e anatomopatologico che come monitoraggio.

La possibilità di discriminare i due sottotipi A e B rappresenta un ulteriore strumento che può, in taluni casi, consentire di distinguere i ceppi vaccinali da quelli di campo e di fornire informazioni di tipo epidemiologico e filogenetico sul virus.

Bibliografia

Cavanagh, D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J., 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology* 28:593-605.

Jane, K., Cook A., Cavanagh D., 2002. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathology* 31:117-132.

Juhasz, K., Easton A.J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology* 75:2873-2880.

Pascucci S., 1996. Pneumovirosi aviare. Degree Diss. Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna sez. Forlì. Italy

Tabella 1. Sequenza dei primers

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA (5'-3')	GENE
G6-	CTGACAAATTGGTCCTGATT	G
G1+	GGGACAAGTATCT/CC/AT/GAT	G
G5-	CAAAGAA/GCCAATAAGCCCA	G
G8+A	CACTCACTGTTAGCGTCATA	G
G9+B	TAGTCCTCAAGCAAGTCCTC	G

Tabella 2. Risultati

APV	SOTTOTIPO
117 negativi	/
5 positivi (tacchino)	3 B (soggetti vaccinati con sottotipoA)
	2 A(soggetti vaccinati con sottotipoB)