

DISCRIMINAZIONE RAPIDA FRA CEPPI VACCINALI E DI CAMPO DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* MEDIANTE TECNICA RFLP

Lupini C.¹, Cecchinato M.², Ricchizzi E.¹, Pesente P.³, Sperati Ruffoni L.³, Catelli E.¹

¹ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Alma Mater Studiorum, Ozzano Emilia (BO)

² Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD)

³ Laboratorio TreValli, San Michele Extra (VR)

Introduzione

I *Metapneumovirus* Aviari (AMPV) sono virus ad RNA appartenenti alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al genere *Metapneumovirus*. Sono causa nel tacchino di una infezione delle prime vie respiratorie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT), mentre nel pollo sono responsabili di forme respiratorie più o meno lievi, che possono sfociare nella Sindrome della Testa Gonfia. Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di AMPV (A, B, C e D), distinti variamente fra loro sia dal punto di vista genetico che biologico e sierologico. I sottotipi A e B sono i più diffusi a livello mondiale essendo presenti in Europa, Asia, Centro e Sud America ed inoltre in Africa, dove l'infezione è comparsa per la prima volta alla fine degli anni 70 (Gough e Jones, 2008).

In Italia l'infezione si è diffusa a partire dal 1987 (Fabris e D'Aprile, 1990). Successivamente si è endemizzata nelle Regioni a maggior vocazione avicola, con prevalenza del sottotipo B (Catelli *et al.*, 2004; Catelli, 2006). Per il controllo TRT sono utilizzati vaccini vivi attenuati; fra quelli disponibili nel nostro Paese è diffuso l'utilizzo del sottotipo B, somministrato nei tacchini da carne, via spray, in incubatoio. È stato dimostrato che ceppi vaccinali possono essere evidenziati tramite RT-PCR fino alla quarta settimana di età (Catelli *et al.*, 2010), associati o meno a sintomatologia respiratoria. In presenza di forme cliniche risulta necessario poter discriminare tra ceppi di campo e di origine vaccinale.

L'analisi della sequenza del gene G di numerosi ceppi AMPV sottotipo B isolati in varie aree geografiche del mondo (Cecchinato *et al.*, 2009), ha rivelato la presenza, nella sola sequenza del vaccino B (ceppo VCO3) maggiormente utilizzato in Italia, di un sito di riconoscimento dall'enzima di restrizione *MseI*. Tale sito è localizzato nell'amplicone che si ottiene con il protocollo di RT nested-PCR messo a punto da Naylor *et al.* (1997), e comunemente impiegato in Europa per la diagnosi delle infezioni da AMPV e la distinzione fra sottotipi A e B.

Basandosi su queste evidenze, è stato messo a punto e testato su alcuni AMPV isolati in Italia, inclusi i ceppi precoci isolati da Catelli *et al.* (2010), un protocollo di PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in grado di discriminare fra ceppi sottotipo B di campo e vaccinali.

Materiali e metodi

1. Ceppi AMPV

Per validare il protocollo sono stati impiegati il ceppo vaccinale AMPV sottotipo B VCO3 e 10 ceppi di campo del medesimo sottotipo (isolati in Italia dal 1987 al 2009) di cui due presentavano sito di riconoscimento dell'enzima *MseI* (tabella 1).

2. PCR-RFLP

2.1. RT nested-PCR

L'RNA virale è stato estratto utilizzando un kit del commercio attenendosi alle istruzioni del produttore (QIAamp viral Mini Kit , Qiagen). La RT nested-PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Naylor *et al.* (1997) e Cavanagh *et al.* (1999). Il prodotto della amplificazione, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, è stato visualizzato mediante colorazione con Sybersafe™ DNA gel stainig (Invitrogen). In presenza di ceppi AMPV appartenenti al sottotipo B si ottiene un amplificato di 340 pb la cui specificità è stata valutata mediante *marker* di riferimento (Φ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen).

2.2. RFLP

L'enzima di restrizione *Mse*I (sito di riconoscimento 5'T¹TAA³) è stato utilizzato per digerire i prodotti ottenuti mediante RT nested-PCR. Il protocollo di restrizione, effettuato in un volume finale di reazione di 20 μ l, ha previsto la digestione a 65°C per 2 ore di 5 μ l di prodotto di amplificazione con 5 unità di enzima di restrizione. Dopo la digestione, i frammenti di DNA ottenuti sono stati separati in gel di agarosio e visualizzati come precedentemente descritto nel paragrafo 2.1. La presenza del residuo A in posizione 91 della sequenza nucleotidica del gene G del ceppo vaccinale, fa sì che il prodotto di RT nested-PCR venga tagliato dall'enzima in due frammenti di 300 e 40 pb ciascuno. L'avvenuta digestione enzimatica è stata verificata mediante confronto col prodotto di PCR non sottoposto a taglio enzimatico e marker di riferimento.

Risultati

Tutti i ceppi AMPV, sottoposti ad RT nested-PCR sottotipo A e B specifica, hanno prodotto un amplificato di 340 pb, caratteristico del sottotipo B. Al taglio enzimatico e successiva corsa elettroforetica, 8 ceppi hanno mostrato bande di dimensione invariate rispetto al prodotto di PCR; mentre il vaccino e 2 ceppi di campo (IT/Ty/129-08/04 ed IT/Ty/132-08/04) hanno prodotto una banda di 300 pb, indice dell'avvenuta digestione enzimatica (figura 1). Non è stato possibile evidenziare il secondo frammento (40 pb) atteso dal taglio enzimatico.

DISCUSSIONE

Questo lavoro riporta la messa a punto di un protocollo di PCR-RFLP che, testato su 10 isolati AMPV sottotipo B ed il vaccino del medesimo sottotipo, comunemente in uso in Italia, ha permesso di discriminare i ceppi di campo dal vaccino e dai ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04. Catelli *et al.* (2010), in un precedente lavoro, avevano dimostrato, mediante analisi filogenetica dei geni G ed F, una strettissima correlazione fra questi ultimi 2 ceppi ed il vaccino facendo supporre la loro origine vaccinale. Questo dato andrà confermato con futuri studi mediante paragone fra la sequenza completa dei ceppi in esame e del vaccino.

Il nostro protocollo di PCR-RFLP si basa su una RT nested-PCR specifica per i sottotipo A e B che è altamente sensibile (Cecchinato *et al.*, 2004) e già in uso in molti laboratori. Esso aggiunge a questa metodica la possibilità di discriminare, qualora venga evidenziata una positività per AMPV sottotipo B, l'origine dell'isolato. Altri autori hanno messo a punto metodiche di laboratorio in grado di identificare il ceppo AMPV vaccinale PL21 basandosi, alternativamente, su metodiche di PCR-

RFLP (Cavanagh *et al.*, 1999) o real-time PCR (Bouley *et al.*, 2009) disegnate su tratti del gene F. Questi protocolli, come anche quello riportato nel presente studio, si basano sulla presenza di una singola mutazione nucleotidica in un tratto specifico del genoma virale. Ciò rende necessario avere a disposizione informazione sui vaccini impiegati nell'area geografica di provenienza dei campioni diagnostici e verificare periodicamente l'evoluzione dei ceppi di campo in modo da non incorrere in false interpretazioni.

La metodica di PCR-RFLP messa a punto permette di discriminare i ceppi di origine vaccinale in maniera rapida ed economica e costituisce una valida alternativa al sequenziamento genico, che, sebbene fornisca informazioni più dettagliate, richiede attrezzature ancora non disponibili su larga scala, specie nei paesi in via di sviluppo, e costi più elevati.

Bibliografia

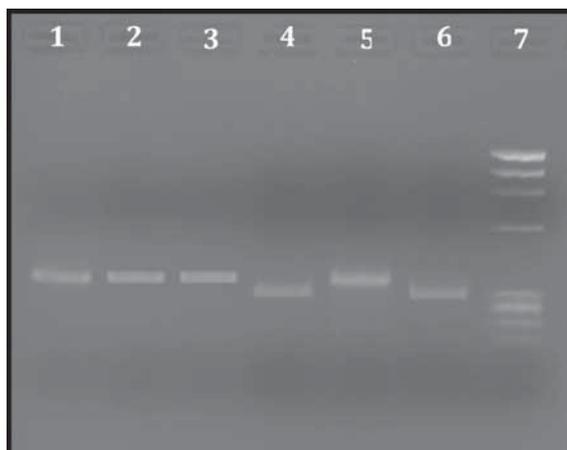
1. Bouley S., Sellal E., Bollart A., Lemiere S. (2009). *Differentiation of Avian Metapneumovirus (AMPV) subgroup B and live Avian Metapneumovirus homologous chicken vaccine using real-time RT-PCR*. 16Th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book. World Veterinary Poultry Congress, Marrakesh (Marocco) 8-12 Novembre 2009 p.281.
2. Catelli E. (2006). *Dati epidemiologici sulle infezioni da Pneumovirus Aviare in Italia*. Giornata di Studio INTERVET "Malattie respiratorie e problemi di produzione" 7 giugno 2006, Bologna, Italia. pp. 19-23.
3. Catelli E., Cecchinato, M., Delogu, M., De Matteo, P., Ortali, G., Franciosi, C., De Marco, M.A., Naylor, C.J., (2004). *Avian Pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey*. Italian Journal of Animal Science. 3: 287-292.
4. Catelli E., Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Brown P., CJ. Naylor. (2010) *Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity*. Vaccine. 28: 916–921.
5. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., CJ. Naylor. (1999) *Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions*. Avian Pathology. 28: 593-605.
6. Cecchinato M., Catelli E., Savage C., Jones RC, CJ. Naylor. (2004) *Design, validation, and absolute sensitivity of a novel test for the molecular detection of avian pneumovirus*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 16:582–585.
7. Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Clubbe J., C.J. Naylor. (2009). *Evidence of AMPV attachment protein evolution coincident with mass live vaccine introduction in Italy*. VI International Symposium on Avian Corona and Pneumovirus and Complicating Pathogens. Rauischholzhausen, Germany, 14-17 Giugno 2009. WB Lauferweiler Verlag, Giessen, Germany, 2009, pp.278-284.
8. Fabris G. e D'Aprile P.N. (1990) *Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio*. Zootecnica International. 6: 36-40.
9. Gough R.E., Jones R.C. (2008). *Avian Metapneumovirus*. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E. (Eds.), Diseases of Poultry, 12th Edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 100-110.
10. Naylor CJ., Shaw K., Britton P., Cavanagh D. (1997). *Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain*. Avian Pathology. 26: 327-338.

Tabella 1. Ceppi di AMPV sottotipo B sottoposti a PCR-RFLP.

| Nome del ceppo | Anno di isolamento | Nucleotidi in posizione 88-91 nel gene G (5'-3') | Riferimento |
|-------------------------------------|--------------------|--|--|
| IT/Ty/Vr240/87 | 1987 | TTAG | Sperati Ruffoni L. (Lab. "Tre Valli") |
| IT/Ty/2a/01 | 2001 | TTAG | Catelli <i>et al.</i> , 2004 |
| IT/Ck/33°/02 | 2002 | TTAG | Catelli <i>et al.</i> , 2004 |
| IT/Ck/34°/02 | 2002 | TTAG | Catelli <i>et al.</i> , 2004 |
| IT/Ty/129-08/04* | 2004 | T [↓] TAA | Catelli <i>et al.</i> , 2010 |
| IT/Ty/129-18/04 | 2004 | TTAG | Catelli <i>et al.</i> , 2010 |
| IT/Ty/132-08/04* | 2004 | T [↓] TAA | Catelli <i>et al.</i> , 2010 |
| IT/Ty/205-16/04 | 2004 | TTAG | Catelli <i>et al.</i> , 2010 |
| IT/Ck/1348-01/07 | 2007 | TTAG | Catelli E. (Università di Bologna) |
| IT/Ty/53/09 | 2009 | TTAG | Catelli E. (Università di Bologna) |
| Ceppo vaccinale sottotipo B - VCO3* | - | T [↓] TAA | - |

* ceppi che alla PCR-RFLP che hanno subito taglio enzimatico

Figura 1. Elettroforesi in gel di agarosio di alcuni ceppi di AMPV sottotipo B sottoposti a PCR-RFLP.



Linea 1: IT/Ty/205-16/04, DNA prodotto della RT nested-PCR per AMPV;

Linea 2: IT/Ty/205-16/04, prodotto della RT nested-PCR sottoposto a digestione con *MseI*;

Linea 3: IT/Ty/129-08/04, DNA prodotto della RT nested-PCR per AMPV;

Linea 4: IT/Ty/129-08/04, prodotto della RT nested-PCR sottoposto a digestione con *MseI*;

Linea 5: Vaccino Ceppo VCO3; DNA prodotto della RT nested-PCR per AMPV;

Linea 6: Vaccino Ceppo VCO3; prodotto della RT nested-PCR sottoposto a digestione con *MseI*;

Linea 7: DNA Marker.