

UTILIZZO DEL PYROSEQUENZIAMENTO PER UNA RAPIDA CLASSIFICAZIONE DELLE SPECIE DI ADENOVIRUS AVIARI DEL GRUPPO I

Pizzuto M.S.^{1*}, De Battisti C.¹, Marciano S.¹, Capua I.¹ & Cattoli G.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, OIE/FAO and National Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease, OIE Collaborating Centre for Epidemiology Training and Control of Emerging Avian Diseases, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy.*

Abstract

Fowl adenoviruses (FAdVs) identification is relevant for epidemiological studies and for the adoption of a correct strategy where vaccination is to be used for the control of the disease. FAdVs typing is usually performed using PCR coupled with either conventional DNA sequencing or restriction enzyme analysis; however both methods can be time consuming and/or very expensive to be used as a routine tool. In this study PCR and subsequent pyrosequence analysis of the variable hexon L1 region were assessed in order to rapidly differentiate fowl adenovirus species. The results clearly demonstrate that pyrosequence analysis provides a new approach for a rapid differentiation and classification of fowl adenovirus that is faster, more cost-effective and easier to interpret than other techniques commonly used.

Riassunto

L'identificazione degli adenovirus aviari del gruppo I (FAdVs) è di notevole importanza sia per studi epidemiologici che per l'adozione di corrette strategie vaccinali, laddove la vaccinazione può essere impiegata nel controllo della malattia. La tipizzazione dei FAdVs è effettuata, in genere, mediante PCR seguita da sequenziamento o dall'analisi con enzimi di restrizione (RFLP). Entrambi i metodi risultano, tuttavia, molto dispendiosi sia in termini di tempo che economici rendendo difficoltosa la loro applicazione nella routine diagnostica.

Nel presente studio l'amplificazione della regione variabile L1 dell'esone seguita dal suo pyrosequenziamento è stata valutata al fine di consentire una rapida genotipizzazione delle specie di adenovirus aviari del gruppo I.

I risultati hanno dimostrato chiaramente che il pyrosequenziamento potrebbe costituire un nuovo strumento per identificare e classificare i FAdVs in maniera più rapida, economica e facilmente interpretabile rispetto alle tecniche comunemente utilizzate.

Introduzione

Gli adenovirus aviari del gruppo I (FAdVs), appartenenti al genere *Aviadenovirus* della famiglia *Adenoviridae*, sono diffusi in tutto il mondo e sono noti per essere causa di ingenti perdite economiche nell'avicoltura. Essi possono sia svolgere il ruolo di patogeni secondari nell'associazione con altri microrganismi sia essere direttamente responsabili di patologie specifiche quali inclusion body hepatitis (IBH) e hydropericardium syndrome (McFerran & Connor, 1977; Christensen & Saifuddin, 1989; Nakamura et al., 1999; Toro et al., 1999; Hess, 2000; Alvarado et al., 2007).

I FAdVs sono stati classificati in 5 specie (dalla A alla E) a seconda della loro struttura molecolare ed ulteriormente suddivisi in 12 sierotipi sulla base dei test di cross-neutralizzazione (Hess, 2000).

L'esone è la proteina principale del capsido virale sulla quale sono localizzati i determinanti specifici per il gruppo e il sottogruppo (Norby, 1969). Il gene dell'esone è costituito da regioni conservate (pedestals), che nella proteina si trovano maggiormente verso l'interno del virione, e da regioni variabili (loops), che protrudono dalla superficie del capsido (Roberts et al., 1986; Athappilly et al., 1994) e che contengono gli epitopi neutralizzanti tipo-specifici (Toogood et al., 1992; Adam et al., 1998). A causa dell'interazione con il sistema immunitario, l'identità di sequenza tra regioni variabili di specie differenti è bassa (Sheppard et al., 1995; Crawford-Miksza & Schnurr, 1996). Il loop 1 (L1) rappresenta la regione maggiormente variabile dell'esone ed è nota per essere la più utile per l'identificazione ed il differenziamento delle specie e dei sierotipi di FAdVs, attraverso l'accoppiamento della PCR con il sequenziamento o con l'analisi mediante enzimi di restrizione (RFLP) (Raue & Hess, 1998; Hess et al., 1999; Meulemans et al., 2001; Steer et al., 2009). Tuttavia tali metodiche richiedono molto tempo, spesso dando risultati di difficile interpretazione e con un costo per analisi che rende scarsamente efficace, dal punto di vista economico, il loro impiego come strumento diagnostico routinario.

Il pyrosequenziamento è stato impiegato con successo in diversi campi per la diagnosi e la genotipizzazione di microorganismi (Ronaghi & Elahi, 2002; Elahi et al., 2003; Swan et al., 2006; Deyde & Gubareva, 2009; Deyde et al., 2009; Quince et al., 2009). Sulla base di queste considerazioni, lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare un metodo rapido di classificazione delle specie di adenovirus aviari del gruppo I, basato sul pyrosequenziamento di un frammento di 30 paia di basi (bp) del loop 1 dell'esone.

Materiali e metodi

Virus. 22 ceppi di riferimento e 27 virus isolati di campo sono stati fatti crescere su monostrati di epatociti (CEL) ottenuti da embrioni di polli SPF di 14 giorni.

Amplificazione del Loop 1 mediante PCR. Sequenze del loop L1 ottenute da Genbank sono state allineate utilizzando il software MEGA 4.1 al fine di identificare una regione di 30 bp in grado di discriminare le diverse specie di FAdVs. La regione conservata a monte di queste 30 bp è stata utilizzata per disegnare i primer forward (FAdV-fw) per la reazione di PCR.

La PCR è stata effettuata utilizzando la coppia di primers FAdV-Pyro-fw ed Hexon B, quest'ultimo precedentemente descritto (Meulemans et al., 2001), generando un amplificato di dimensioni comprese tra 740 bp (FADV-4, FADV-10) e 765 bp (FADV-5).

Sequenziamento e analisi in Blast. Le sequenze dei prodotti di PCR del loop 1, sono stati analizzati tramite ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem Inc.) ed allineate usando il programma Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per confermare l'identità dei ceppi virali. L'analisi filogenetica delle sequenze è stata svolta con l'ausilio del software MEGA 4.1 al fine di verificare il clustering dei vari ceppi nelle rispettive specie. **Pyrosequenziamento.** La reazione di PCR per il pyrosequenziamento è stata eseguita impiegando il primer reverse biotinilato (Hexon B [Biotag]). I prodotti di amplificazione sono stati immobilizzati su biglie di sefarosio ricoperte da streptavidina e lavati in una serie di buffers come raccomandato dalla

Biotage. I filamenti biotinilati di DNA sono stati ibridizzati il primer FAdV-Pyro-Fw in una piastra da 96 pozzetti e la reazione di pyrosequenziamento è stata effettuata nel pyrosequenziatore (Pyromark ID) seguendo le istruzioni del produttore. Le sequenze risultanti sono state analizzate e allineate per omologia a quelle, derivate da Genbank, presenti nella libreria “FAdV Library” usando il software IdentiFire (Biotage). L’accuratezza delle sequenze ottenute è stata confermata per confronto con quelle generate tramite il sequenziamento convenzionale.

Risultati e Discussione

Tutti i campioni testati hanno dato prodotti di PCR delle dimensioni attese in gel d’agarosio, senza bande aspecifiche. L’analisi delle sequenze dei ceppi di riferimento e degli isolati di campo ha confermato l’amplificazione della regione L1 e l’identità dei FAdVs analizzati.

I risultati del pyrosequenziamento si sono dimostrati coerenti con quelli derivati dal sequenziamento convenzionale e dalla successiva analisi filogenetica.

Basandosi su un frammento di 30 bp è stato possibile suddividere tutti i FAdVs testati (22 ceppi di riferimento e 27 isolati di campo) nelle corrette specie (A-E) e riuscire a tipizzare direttamente numerosi sierotipi (1, 2, 3, 5, 6, 9 e 11), laddove la classificazione stabilita sulla base dei risultati di cross-neutralizzazione rifletteva l’omologia di sequenza.

Tra i vari vantaggi del pyrosequenziamento vi è senz’altro quello di essere tollerante alle mutazioni. Spesso, infatti, gli isolati di campo presentano delle mutazioni nucleotidiche che possono determinare la scomparsa di un sito di restrizione nel caso della RFLP o lo shift della temperatura di melting nel caso dell’analisi HRM (High Resolution Melting-Curve). Questo può aumentare le difficoltà nell’identificazione dei virus e nella loro corretta classificazione. Nel nostro studio al contrario 27 isolati di campo sono stati analizzati dando altrettante sequenze con una accuratezza del 100% entro i primi 30 nucleotidi, grazie alla chimica della reazione di pyrosequenziamento.

Partendo dalla reazione di PCR il pyrosequenziamento richiede solo 2 ore per ottenere i risultati di 96 campioni, circa metà del tempo necessario per l’RFLP o per il sequenziamento convenzionale.

Tenendo conto di tutti i reagenti necessari, i costi stimati per il pyrosequenziamento sono circa la metà di quelli della reazione di sequenziamento convenzionale.

Conclusioni

Studi futuri saranno necessari per valutare le potenzialità del pyrosequenziamento per una rapida classificazione degli adenovirus aviari del gruppo I direttamente da campioni clinici (fegato, trachea, ovidutto per es.). Se l’esame diretto dovesse risultare applicabile la tempistica di analisi si ridurrebbe ulteriormente e si potrebbe in poche ore identificare la specie di adenovirus responsabile della problematica evidenziata in campo.

Nell’insieme il metodo di pyrosequenziamento descritto fornisce un nuovo strumento per la diagnosi e tipizzazione degli adenovirus aviari del gruppo I e pertanto potrebbe essere di supporto nell’identificazione e nella rapida classificazione delle diverse specie di FAdVs per la diagnostica routinaria, per studi epidemiologici e per la corretta applicazione delle strategie vaccinali.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato sponsorizzato dal Ministero della salute (Ricerca Corrente 29/07). Gli autori vogliono ringraziare il Dr. Thierry van den Berg Head of Avian Virology & Immunology Veterinary and Agrochemical Research Centre (VAR) Brussels per aver gentilmente fornito i seguenti ceppi di adenovirus aviari: 685, 75, 764, 58, 506, YR36, TR22, CR119, KR5, A-2A, X-11A, J2-A, C2B, IBH-2A, B3A, P7-A, 75-1A-1, T8-A.

Bibliografia

1. Adam, E., Nasz, I., Hudecz, F., Lengyel, A., Mezo, G. & Dobay, O. (1998). Characterization of intertype specific epitopes on adenovirus hexon. *Archives of Virology*. 143, 1669-1682.
2. Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J., Jensen, E., Rosales, G., Perozo, F. & Purvis, L.B. (2007). Genetic characterization, pathogenicity, and protection studies with an avian adenovirus isolate associated with inclusion body hepatitis. *Avian Diseases*. 51, 27-32.
3. Athappilly, F.K., Murali, R., Rux, J.J., Cai, Z. & Burnett, R.M. (1994). The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus 2, at 2.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 242, 430-455.
4. Christensen, N.H. & Saifuddin, M. (1989). A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. *Avian Diseases*. 33, 622-630.
5. Crawford-Miksza, L. & Schnurr, D.P. (1996). Analysis of 15 adenovirus hexon proteins reveals the location and structure of seven hypervariable regions containing serotype-specific residues. *Journal of Virology*. 70, 1836-1844.
6. Deyde, V.M. & Gubareva, L.V. (2009). Influenza genome analysis using pyrosequencing method: current applications for a moving target. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 9, 493-509.
7. Deyde, V.M., Nguyen, T., Bright, R.A., Balish, A., Shu, B., Lindstrom, S., Klimov, A.I. & Gubareva, L.V. (2009). Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 1039-1047.
8. Elahi, E., Pourmand, N., Chaung, R., Rofoogaran, A., Boisver, J., Samimi-Rad, K., Davis, R.W. & Ronaghi, M. (2003). Determination of hepatitis C virus genotype by Pyrosequencing. *Journal of Virological Methods*. 109, 171-176.
9. Hess, M. (2000). Detection and differentiation of avian adenoviruses: a review. *Avian Pathology*. 29, 195-206.
10. Hess, M., Raue, R. & Prusas, C. (1999). Epidemiological studies on fowl adenovirus isolated from cases of infectious hydropericardium. *Avian Pathology*. 28, 433-439.
11. McFerran, J.B. & Connor, T.J. (1977). Further studies on the classification of fowl adenoviruses. *Avian Diseases*. 21, 585-595.
12. Meulemans, G., Boschmans, M., Berg, T.P. & Decaesstecker, M. (2001). Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian pathology*. 30, 655-660.
13. Nakamura, K., Mase, M., Yamaguchi, S., Shibahara, T. & Yuasa, N. (1999). Pathologic study of specific-pathogen-free chicks and hens inoculated with

- adenovirus isolated from hydropericardium syndrome. *Avian Diseases*. 43, 414-423.
14. Norby, E. (1969). The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. IV. Immunological complexity of soluble components. *Virology*. 37, 565-576.
 15. Quince, C., Lanzen, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M., Read, L.F. & Sloan, W.T. (2009). Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature methods*. 6 (9), 639-641.
 16. Raue, R. & Hess, M. (1998). Hexon based PCRs combined with restriction enzyme analysis for rapid detection and differentiation of fowl adenoviruses and egg drop syndrome virus. *Journal of Virological Methods*. 73, 211-217.
 17. Roberts, M.M., White, J.L., Grutter, M.G. & Burnett, R.M. (1986). Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science*. 232, 1148-1151.
 18. Ronaghi, M. & Elahi, E. (2002). Pyrosequencing for microbial typing. *Journal of Chromatography B*. 782, 67-72.
 19. Sheppard, M., McCoy, R.J. & Werner, W. (1995). Genomic mapping and sequence analysis of the fowl adenovirus serotype 10 hexon gene. *Journal of General Virology*. 76, 2595-2600.
 20. Steer, P.A., Kirkpatrick, N.C., O'Rourke, D. & Noormohammadi, A.H. (2009). Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of the hexon gene region. *Journal of Clinical Microbiology*. 47, 311-321.
 21. Swan, D.C., Limor, J.R., Duncan, K.L., Rajeevan, M.S. & Unger, E.R. (2006). Human papillomavirus type 16 variant assignment by pyrosequencing. *Journal of Virological Methods*. 136, 166-170.
 22. Toogood, C.I., Crompton, J. & Hay, R.T. (1992). Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. *Journal of General Virology*. 73, 1429-1435.
 23. Toro, H., Prusas, C., Raue, R., Cerda, L., Geisse, C., Gonzalez, C. & Hess, M. (1999). Characterization of fowl adenoviruses from outbreaks of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome in Chile. *Avian Diseases*. 43, 262-270.