

COMUNICAZIONE 12**ISOLAMENTO E TIPIZZAZIONE PRELIMINARE DI UNA POTENZIALE NUOVA VARIANTE DEL VIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE****A. Moreno Martin¹, P. Cordioli¹, F. Paganelli², A. Treccani³, A. Zanella⁴, A. Lavazza¹**¹Reparto Virologia Specializzata - IZS Lombardia ed EmiliaBrescia; ²Sezione di Forlì - IZS Lombardia ed Emilia; ³Veterinario Libero Professionista, Brescia; ⁴Sezione di Microbiologia ed Immunologia, Facoltà Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano

Parole chiave: bronchite infettiva, coronavirus, ceppo virale, PCR, neutralizzazione, tipizzazione

Isolation and typing of a potential new variant of the avian infectious bronchitis virus

Key words: infectious bronchitis, coronavirus, viral strain, PCR, neutralisation, typing

Summary: A strain of IBV, called 216/01, recently isolated from broiler with respiratory disease was characterised by using RT-PCR and virusneutralisation test with reference sera 793-B, 624-I, Massachusetts M41, Connecticut, D274, Arkansas 99, Australia T, J.M.K., Grey and some antisera against the main variants described in Italy. Preliminary data indicates this strain as apparently different from the viral strains actually diffused in North Italy.

Corrispondente: Ana Moreno Martin, Reparto Virologia specializzata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna., Via Bainchi 9. 25124 Brescia. Tel. +39-030 2290331. Fax. +39-030 2425251. E-mail: amoreno@ibs.izs.it

Introduzione

Negli ultimi anni, la bronchite infettiva aviaria sta causando notevoli problemi sanitari ed economici nella industria avicola italiana, specialmente nel settore dei broilers, ma anche nelle ovaiole e nei riproduttori. Ciò è in parte dovuto alla notevole variabilità antigenica dei ceppi virali coinvolti che, malgrado l'uso diffuso negli allevamenti intensivi di presidi immunizzanti con il ceppo classico M41 e talvolta con il ceppo 4/91 (793B), continuano a determinare la comparsa di forme cliniche causa di rilevanti perdite economiche. Anche il tropismo virale diviene sempre più variabile e si manifesta con differenti forme cliniche, dalle respiratorie o renali più frequenti nei broilers a quelle caratterizzate da calo di ovodeposizione ed alterazione della qualità del guscio tipiche di ovaiole e riproduttori.

A partire dal 1956 (2), si sono progressivamente identificati nuovi sierotipi o varianti di IBV nei vari continenti, isolati anche da polli vaccinati con il ceppo classico Massachusetts. A tutt'oggi sono stati riportati oltre 60 sierotipi e, tuttavia, si pensa che solo una piccola parte di quelli esistenti sia stata individuata. L'elevata variabilità del virus sarebbe riconducibile fondamentalmente alle modificazioni che si verificano a carico di una sola proteina strutturale, la proteina S degli spikes, la cui sequenza aminoacidica, nei diversi sierotipi, può presentare variazioni, a volte anche solo di pochi aminoacidi (1).

Lo scopo del presente lavoro è quello di riferire in merito all'isolamento di un ceppo del virus della bronchite infettiva aviaria (BS 216/01) che, in base alla tipizzazione preliminare, potrebbe rappresentare una nuova variante.

Materiali e Metodi

Anamnesi. Allevamento di ovaiole leggere di 23 settimane di età che, nonostante diversi trattamenti vaccinali nei confronti della bronchite infettiva con vaccini attenuati H120 e 4/91 e inattivato contenente il ceppo M41 e le varianti olandesi, presentavano mancato raggiungimento del picco di ovodeposizione ed alterazioni della qualità del guscio.

Isolamento ed identificazione virale. Il virus è stato isolato da tamponi cloacali sospesi in MEM antibiotato

ed inoculati in cavità allantoidea di uova embrionate di pollo di 9-11gg., incubate a 37°C e sperate quotidianamente. A partire dal 7°-8° giorno di incubazione gli embrioni erano esaminati per valutare la comparsa delle lesioni tipiche tra le quali in particolare: nanismo, arrotolamento ed arricciamento delle piume. Le lesioni sono state evidenziate dopo due passaggi ciechi. La diagnosi è stata quindi confermata dalla individuazione di particelle virali riferibili a coronavirus, in microscopia elettronica con colorazione negativa (microscopio TEM Philips CM10 operante a 80 Kv, a 28500 ingrandimenti).

Per la caratterizzazione si è fatto ricorso sia ad un test di virus-neutralizzazione sia alla tipizzazione sierologica che alla caratterizzazione molecolare in PCR.

Virus-Neutralizzazione (VN): È stato applicato il metodo α : virus variante (diluizioni \log_{10}), siero costante (diluizione 1:5). Le diverse diluizioni del virus vengono a contatto con gli antisieri specifici per 1h a temperatura ambiente ed in seguito ogni diluizione viene inoculata su 4 uova embrionate di pollo in cavità allantoidea. Dopo 7-8gg di incubazione a 37°C ed una speratura giornaliera, vengono osservati gli embrioni per valutare la presenza di lesioni specifiche. L'indice di neutralizzazione (IN) viene espresso come valore \log_{10} calcolato con il metodo Reed e Muench.

Sono stati testati diversi antisieri: 793-B (siero di referenza), 624-I (fornito da Dr. Capua I., IZS delle Venezie, Padova), Massachusetts M41, Connecticut, D274, Arkansas 99, Australia T, J.M.K., Gray (sieri di collezione). Inoltre sono stati utilizzati antisieri di produzione propria nei confronti di ceppi nefropatogeni isolati in Italia AZ 23/74, FA 6881/97 e PV 1731/65 (4). Il ceppo BS216/01 è stato testato anche con il siero omologo.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): Dal liquido allantoideo raccolto in seguito al terzo passaggio su UEP, è stata eseguita la PCR secondo la metodica dettagliatamente descritta (3). La prova è stata condotta in due fasi, dapprima con dei primers universali su tutti i ceppi per la sola individuazione del virus della bronchite infettiva e successivamente con l'utilizzo di diversi primers

specifici in grado di riconoscere alcuni dei principali ceppi di IBV: M41, 793B e D274.

Risultati e Discussione

Il dettaglio dei risultati ottenuti nelle singole prove è riportato in Tabella 1. Gli esiti della prova di VN appaiono particolarmente significativi, considerato che soltanto il siero omologo ha fornito un indice di neutralizzazione elevato, mentre in tutti gli altri casi il risultato è stato nettamente negativo, contrariamente a quanto si osserva solitamente con la maggior parte dei ceppi isolati, per i quali si osservano costantemente alcune reazioni crociate anche se con titoli variabili ma spesso <2.

Tabella 1: Risultati delle prove di tipizzazione del ceppo BS216/01

Table 1: Results of the tests adopted for typing the BS216/01 IBV strain

SIERI	VN	PCR
BS216/01	6	n.e.
M41	<1	NEG
793B	<1	NEG
624I	<1	n.e.
D274	<1	NEG
J.M.K.	<1	n.e.
Grey	<1	n.e.
Australia T	<1	n.e.
Con	<2	n.e.
Ark 99	<1	n.e.
FA6881	<1	n.e.
AZ23/74	<1	n.e.
PV1731/65	<1	n.e.

n.e. = non eseguito

La RT-PCR conferma, seppur soltanto parzialmente considerata l'attuale limitata disponibilità di primers, l'esito ottenuto con la prova di VN. Le tre varianti testate, tra le più diffuse negli allevamenti italiani, hanno infatti fornito esito negativo.

Affiancando i dati anamnestico-clinici dell'allevamento interessato, gli esiti analitici delle prove suddette e l'individuazione virale ottenuta in microscopia elettronica, appare possibile determinare con certezza la diagnosi di Bronchite Infettiva; l'esito della prova di VN e quelli preliminari della prova di RT-PCR inducono a pensare ad un ceppo poco diffuso o ad una variante potenzialmente nuova per la realtà italiana. Ciò anche in considerazione del fatto che tra i sieri testati sono compresi anche alcuni sieri omologhi ottenuti da ceppi (FA6881/97, AZ23/74, PV 1731/65) isolati in Italia (4).

Conclusioni

I risultati osservati consentono di ipotizzare l'isolamento di una potenziale nuova variante del virus IBV, per la quale si ritiene di conseguenza necessario approfondire l'osservazione tramite ulteriori indagini di caratterizzazione molecolare.

Il presente isolamento porta comunque l'attenzione ancora una volta al problema dell'elevata variabilità che questo agente patogeno presenta e che giustifica l'esigenza di una più approfondita sorveglianza epidemiologica ed anche ad una riconsiderazione sulla scelta dei ceppi (Classico M41 e di recente in Italia 793B) utilizzati per l'allestimento dei presidi vaccinali.

Bibliografia

1. Cavanagh, D. (1998). Discussion of issues raised during the 1998 International Symposium of Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry. Ranischholzhausen, June 15-18 1998, 373-380.
2. Jungherr, E.L.; Chromiak, T.W., Luginbuhl, R.E. (1956). Immunological differences in strains of Infectious bronchitis. Proc. 6th Ann. Meet. USLSA, 203-205.
3. Paganelli F., Tosi G., Masi P. (2001). Applicazione e confronto critico fra l'utilizzo delle uova embrionate di pollo e polymerase chain reactions, per l'identificazione del virus della Bronchite Aviare. Atti del 40° Convegno SIPA, in corso di stampa.
4. Zanella A., Coaro R., Marchi R., Fabris G., Lavazza A. (2000). Avian infectious bronchitis virus: isolation of an apparently new variant in Italy. Vet Rec 146, 191-193.