

COMUNICAZIONE 23

IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO CON LA POLYMERASE CHAIN REACTION

F. PAGANELLI, P. MASSI, G. TOSI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

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

Detection of chicken infectious anaemia virus with polymerase chain reaction

Key words: chicken infectious anaemia virus, polymerase chain reaction, MDCC-MSB1, isolation of the virus

Summary: Chicken infectious anaemia virus (CIAV) causes aplastic anaemia, generalized lymphoid atrophy and increased mortality in susceptible chickens. CIAV is a nonenveloped, icosahedral, single-stranded DNA virus in the family Circoviridae. Three proteins are expressed in CIAV-infected cells, VP1, VP2 and VP3. The diagnosis of CIAV has typically been carried out by serological procedures and isolation of the organism. Therefore, molecular techniques such as polymerase chain reaction have been widely used to detect viral DNA in infected cells.

Correspondence: Francesca Paganelli - Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Sezione di Forlì- Via Marchini 1- 47100 Forlì. Email forli@bs.izs.it

Introduzione

Il virus dell'anemia infettiva del pollo (CIAV) appartiene alla famiglia *Circoviridae* e al genere *Gyrovirus*. CIAV ha una struttura icosaedrica ed è privo di *envelope*. Il capsido, è costituito da una sola proteina e contiene DNA circolare a banda singola di 2319 nucleotidi. Il genoma codifica tre proteine virali note: VP1, VP2 e VP3, sintetizzabili e reperibili nella cellula infetta. VP1 è una proteina capsidica, mentre VP2 non sembra sia una proteina strutturale, pur risultando indispensabile per l'assemblaggio del virus e per la stimolazione anticorpale neutralizzante. La proteina VP3, piccola proteina composta di 121 aminoacidi, è una apoptina perché coinvolta nel fenomeno di apoptosi. CIEV è responsabile di una patologia caratterizzata da anemia aplastica, atrofia linfoide e conseguente immunodepressione. Nella sua forma acuta la malattia si osserva nei primi 20 giorni di vita come conseguenza della trasmissione verticale del virus. CIAV può inoltre provocare, nelle fasi successive del ciclo di allevamento, infezioni subcliniche legate alla trasmissione orizzontale del virus e responsabili di sensibili peggioramenti degli indici zootecnici dei gruppi colpiti. Ai fini diagnostici si utilizzano come test sierologici l'immunofluorescenza indiretta (IFI) e l'ELISA; mentre per l'isolamento virale sono necessarie le colture cellulari. Il virus replica soltanto su particolari linee linfoblastoidi, originate da linfomi della malattia di *Marek* (MDCC) o della Leucosi aviare (LSCC) e coltivate in sospensione. La linea più usata è senza dubbio la MDCC-MSB1 (linfoma splenico). Con questo lavoro si è cercato di valutare la possibilità di utilizzare la *polymerase chain reaction* (PCR) per identificare CIAV, grazie alla presenza nel genoma di sequenze altamente conservate (1), interessate nella sintesi delle tre proteine note.

Materiali e metodi

Infezione su colture cellulari

Sono stati presi in esame 10 casi clinici che presentavano un quadro anatomopatologico riferibile a CIAV. Il campione di partenza, costituito da fegato, milza e midollo osseo, è stato omogenizzato con PBS antibiotato, centrifugato a 3,000 x g e filtrato a 450 nm. Per la ricerca del CIAV sono state utilizzate colture cellulari in sospensione MDCC-MSB1, che richiedono

il *medium* RPMI-1640 con il 7% di siero fetale bovino e il 7% di tryptose phosphate broth (TPB). Le flask da 25 cm², contenente circa 3 x 10⁵ cell/ml, sono state inoculate con 0,8 ml del sovrantante ottenuto e 7,2 ml della sospensione cellulare. Le colture cellulari sono state incubate a 39°C, CO₂ 5%.

Ogni 48 ore è stata effettuata una subcultura, allo scopo di aumentare il numero delle cellule disponibili e di indurre un nuovo ciclo evolutivo della linea.

Le subcolture sono state eseguite fino a quando non si è presentato l'effetto citopatico ben visibile al microscopio ottico: mortalità cellulare, cellule globose e deformi, disaggregazione della cromatina con occasionale presenza di vacuoli nucleari.

Estrazione del DNA e PCR

L'estrazione del DNA virale dalla sospensione cellulare è stata eseguita secondo il protocollo QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-Hilden®, Germany).

Il prodotto di estrazione è stato utilizzato direttamente nel saggio di PCR previa l'aggiunta dei reagenti e del tampone necessario che fanno parte della PlatinumTaqPCRx DNAPolymerase (Invitrogen®, USA). Fungono da innesco alla reazione di amplificazione il primer "forward" P3+ e il primer "reverse" P4- che producono un frammento di 252bp (4) (Tabella 1), interessato nella sintesi della proteina VP2 e VP3.

I campioni di DNA sono stati analizzati mediante un'altra PCR usando i primers CA1N+ e CA2N-, che corrispondono alla posizione nucleotidica 503-522 e 982-963 del genoma virale (2) (Tabella 1). Il frammento amplificato è di 480bp e fa parte dei geni che codificano per la VP1 e la VP3. La reazione di PCR avviene secondo il seguente profilo: 5 minuti a 94°C, seguiti da 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30 secondi, *annealing* a 60°C per 30 secondi e l'estensione a 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 uno negativo.

La specificità del prodotto di PCR è stata confermata con l'utilizzo degli enzimi di restrizione PstI e SacI (3).

Risultati

I 10 campioni esaminati hanno presentato sulle MDCC-MSB1 l'effetto citopatico riferibile al virus dell'anemia infettiva fra la 5° e l'8° subcoltura.

E' importante evidenziare che un campione viene ritenuto negativo per CIAV dopo aver eseguito 10 subcolture, sempre in doppio.

Con la tecnica di PCR tutte le 10 sospensioni cellulari sono risultate positive con entrambe le coppie di primers utilizzate (Tabella 2).

Discussione

Questi primi dati hanno rilevato una possibile applicazione della metodica PCR per l'identificazione del virus dell'anemia infettiva; tutti i campioni hanno presentato una correlazione positiva fra i dati anamnestici, il quadro anatomopatologico, l'esame su MCD-MSB1 e mediante PCR. E' importante evidenziare la possibilità di controllare ulteriormente il prodotto di PCR con specifici enzimi di restrizione. Entrambe le coppie di primer (CA1N-CA2N e P3-P4) sono risultate specifiche e sensibili ai 10 isolati di CIAV.

La tecnica di amplificazione rende possibile un risultato diagnostico in minor tempo rispetto all'utilizzo delle colture cellulari: 2 giorni contro i 15-20 giorni necessari per le colture cellulari. Inoltre è possibile rilevare la presenza del virus anche se non si presenta in fase replicativa; infatti, con l'utilizzo della PCR non è

Tabella 1: Sequenza e posizione dei primers

Table 1: Sequence and position of primers

NOME	SEQUENZA (5'-3')	POSIZIONE NUCLEOTIDICA
P3	AATGAACGCTCTCCAAGAAG	464-483
P4	GGAGGCTTGGGTTGATCGGTC	715-695
CA1N	CCAAGAAGATACTCCACCCG	503-522
CA2N	TACGATACCGCTGTCTCCTC	982-963

possibile valutare se il virus è vivo o integro. Questa metodica di amplificazione può essere usata per un monitoraggio di assenza o presenza del DNA virale, anche semplicemente come controllo di contaminazione delle linee cellulari utilizzate in diagnostica.

Ringraziamenti

Si ringrazia per la preziosa collaborazione il sig. Angelo Biondi, tecnico di laboratorio della Sezione IZSLER di Forlì

Bibliografia

1. Farkas T., Tanaka A., Kai K., Kanoe M. (1996). "Cloning and sequencing of the genome of chicken anaemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strains." J. Vet. Med. Sci. 58, 681-684.
2. Imai K., Mase M., Yamaguchi S., Yausa N., Nakamura K., (1998). "Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction". Res.Vet. Sci. 64, 205-208.
3. 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 Anemia, Rauschholzhausen, Germany, 16-20 June 2001, 130-143.
4. Yamaguchi S., Kaji N., Munang'andu M., Kojima C., Mase M., Tsukamoto K. (2000). "Quantification of chicken anaemia virus by competitive polymerase chain reaction". Avian Pathol., 29, 305-310.

Tabella 2: Risultati ottenuti su MCD-MSB1 e mediante PCR

Table 2: Comparative results between MDCC-MSB1 and PCR.

CAMPIONI	MCCD-MSB1	PCR (P3-P4)	PCR (CA1N-CA2N)
1	+ (5° subcoltura)	+	+
2	+ (5° subcoltura)	+	+
3	+ (7° subcoltura)	+	+
4	+ (6° subcoltura)	+	+
5	+ (8° subcoltura)	+	+
6	+ (6° subcoltura)	+	+
7	+ (7° subcoltura)	+	+
8	+ (7° subcoltura)	+	+
9	+ (6° subcoltura)	+	+
10	+ (5° subcoltura)	+	+