

COMUNICAZIONE 23

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ROTAVIRUS IDENTIFICATI IN CORSO DI FOCOLAI DI ENTERITE TRASMISSIBILE DELLA STARNA (*PERDIX PERDIX*): RISULTATI PRELIMINARI

M. Battilani¹, M.V. Murgia¹, A. Lavazza², M. Cecchinato¹, E. Catelli¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna, Ozzano Emilia (BO); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia

Parole chiave: rotavirus, elettroferotipi, tipizzazione molecolare, starna, enterite

Molecular characterization of rotavirus found during outbreaks of transmissible enteritis in Grey partridge (*Perdix perdix*): preliminary results

Key words: rotavirus, electropherotypes, molecular characterization, grey partridge, enteritis

Summary: Electrophoretic analysis (PAGE) of the viral dsRNA was carried out on intestinal samples of grey partridge chicks experiencing transmissible enteritis and found to be positive by electron microscopy for rotavirus. The samples were obtained from three game farms sited in the North of Italy, and in one of them, repeated outbreaks occurred in different years. PAGE produced eleven bands arranged in the typical "short pattern". All the samples examined, apart from farms or years of sampling, showed an identical electrophoretic pattern suggesting that a specific electropherotype of rotavirus had affected this avian species. This preliminary conclusion needs to be confirmed by further research.

Correspondence: Mara Battilani - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria – Via Tolara di Sopra 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO). Email MBattilani@vet.unibo.it

Introduzione

I Rotavirus sono virus a RNA responsabili di gravi patologie post-natali in mammiferi ed uccelli; le enteriti da rotavirus vanno assumendo un ruolo preminente negli allevamenti avicoli a causa delle significative perdite economiche che determinano (6).

La presenza di rotavirus in corso di infezioni enteriche nella starna è stata evidenziata alla microscopia elettronica alla fine degli anni '80 (2, 6). Forme di enterite trasmissibile, causa di elevata mortalità nella prima settimana di vita, verosimilmente riferibili alla stessa eziologia, erano state già precedentemente segnalate (3, 7) in allevamenti di starne a scopo di ripopolamento. Nell'ambito dei rotavirus vengono distinti 7 sierogruppi (A, B, C, D, E, F, G) sulla base delle caratteristiche antigeniche della proteina capsidica VP6 e numerosi elettroferotipi sulla base della mobilità elettroforetica degli 11 segmenti di RNA a doppia catena (dsRNA) (1). I dati relativi alle caratteristiche antigeniche e genomiche dei rotavirus aviari sono scarsi, soprattutto a causa delle difficoltà nell'adattare in coltura cellulare tali ceppi che appartengono in prevalenza al gruppo non-A, per cui ai fini di uno studio approfondito delle caratteristiche di tali virus si rende necessario il ricorso a metodiche biomolecolari. L'elettroforesi in condizioni denaturanti permette la caratterizzazione preliminare dei rotavirus mediante l'analisi dei profili di migrazione elettroforetica degli 11 segmenti di dsRNA (8, 9). La presenza di differenti profili elettroforetici dipende dal riassortimento genico tipico dei virus a genoma segmentato. L'analisi accurata degli elettroferotipi consente di effettuare indagini epidemiologiche e di individuare la presenza di eventuali ceppi endemici.

Il presente lavoro riporta i risultati dell'analisi elettroforetica svolta su ceppi di rotavirus identificati in focolai di enterite trasmissibile della starna allo scopo di individuare gli elettroferotipi circolanti in tale specie.

Materiali e Metodi

Campioni. Sono stati esaminati intestini provenienti da 3 allevamenti di starne (A, B, C) situati in diverse province del Nord Italia in corso di focolai di enterite trasmissibile. I campioni dell'allevamento A sono relativi a focolai ripetuti dal 2000 al 2002 (Tabella 1).

Tabella 1: Campioni esaminati

Table 1: Examined samples

Anno	Campione	Allevamento (provincia)	
2000	723/02	A	(Modena)
2001	891/01	A	(Modena)
2001	630/02	A	(Modena)
2001	1460/01	A	(Modena)
2002	403/02	A	(Modena)
2002	405/02	A	(Modena)
2002	508/02	A	(Modena)
2002	484/03	B	(Pavia)
2002	714/02	C	(Verona)

I soggetti colpiti avevano un'età compresa tra 3 e 7 giorni e presentavano depressione del sensorio, ali abbassate, tendenza a rimanere immobili e diarrea acquosa. All'esame anatomico-patologico si osservava dimagrimento e disidratazione notevoli, intestino tenue ectasico, con contenuto sieroso o catarrale e materiale alimentare indigerito. I ciechi si mostravano notevolmente ectasici per la presenza nel lume di liquido di color giallo-nocciola con grosse bolle di gas (Figura 1).

Figura 1. Starnotto con enterite trasmissibile: notevole ectasia dei ciechi e dell'ansa duodenale

Figure 1. Young grey partridge with transmissible enteritis: remarkable ectasia of caeca and duodenum



1
2
3
4
5

Microscopia elettronica. I campioni sono stati allestiti utilizzando la ~~7,8,9~~ tecnica Airfuge comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia ed esaminati con un TEM Philips CM10, operante a 80kV. L'identificazione delle particelle virali, osservate ad ingrandimenti compresi fra 15500 e 39000x, era eseguita sulla base delle caratteristiche morfologiche tipiche dei virioni (5).

Estrazione RNA virale. L' RNA a doppia catena dei Rotavirus è stato estratto dai pool intestinali utilizzando un Kit del commercio, l'RNeasy Mini Kit (Qiagen) attenendosi alle indicazioni della ditta fornitrice. Brevemente, gli intestini ancora congelati sono stati sminuzzati con mortaio e pestello, 30 mg del tessuto omogenato sono stati trattati con 600 µl di un buffer di lisi contenente β-mercaptoetanololo. Dopo trattamento del campione con 600 µl di etanolo al 70% la soluzione è stata trasferita nella "RNeasy mini spin column" e sottoposto ad una serie di lavaggi con specifici buffers. L' RNA virale è stato eluito in 50 µl di acqua RNasi free e precipitato in etanolo. Il dsRNA così trattato è stato stoccato a -80°C fino al momento del suo utilizzo.

Elettroforesi dell'RNA virale. Il dsRNA virale preventivamente denaturato è stato sottoposto ad elettroforesi in gel di poliaccrilamide in condizioni denaturanti (PAGE) (8). Cinque µl di RNA, miscelati con un buffer denaturante costituito da 5 µl di formamide e 5 µl di TBE-urea sample buffer (Invitrogen), sono stati sottoposti a trattamento termico a 70°C per 10 minuti. L'elettroforesi è stata condotta a 200V per 4-5 ore in gel di acrilamide al 6% - 6M di urea.

Risultati

La microscopia elettronica ha evidenziato la presenza di rotavirus in tutti i campioni esaminati (Figura 2).

L'elettroforesi dell'RNA virale ha evidenziato un unico elettroferotipo comune a tutti i campioni esaminati. Gli 11 segmenti di dsRNA sono divisi in quattro gruppi in base al peso molecolare: gruppo I (segmenti 1-2-3-4), gruppo II (segmenti 5-6), gruppo III (segmenti 7-8-9), gruppo IV (segmenti 10-11). Sulla base della mobilità di migrazione elettroforetica dei segmenti 10-11 l'elettroferotipo evidenziato nella starna appartiene allo "short pattern" (4) (Figura 3).

Discussione

L'analisi elettroforetica condotta su ceppi di rotavirus identificati in corso di focolai di enterite trasmissibile, ha consentito di evidenziare il profilo genomico dell'RNA virale consistente di 11 segmenti migrati in quattro distinte regioni del gel in accordo con i relativi pesi molecolari. Il profilo elettroforetico è risultato uguale in tutti i ceppi esaminati indipendentemente dall'anno di occorrenza e dall'allevamento di provenienza. Sebbene non sia definita una correlazione tra il pattern elettroforetico dell'RNA e le caratteristiche antigeniche dei rotavirus, il fatto di avere identificato un unico elettroferotipo ci porta ad ipotizzare che la starna sia colpita da un rotavirus specifico. Ulteriori indagini permetteranno di confermare o meno tale ipotesi.

Bibliografia

1. Estes M.K., Cohen J. (1989). "Rotavirus gene structure and function". Microbiology Review, 53, 410-449.
2. Gough R.E., Collins M.S., Alexander D.J., Cox W.J. (1990). "Viruses and virus-like particles detected in samples from diseased game birds in Great Britain during 1988". Avian Pathology, 19, 331-342.

3. Govoni S., Maestrini N. (1979). "Considerazioni sulle forme morbose dell'avifauna allevata intensivamente allo scopo venatorio, riscontrate presso l'Istituto di Patologia Aviare di Bologna nel periodo 1/8/1976 - 31/8/1978". La Clinica Veterinaria, 102(4), 309-314.
4. Kalica A.R., Greenberg H.B., Espejo R.T., Flores J., Wyatt R.G., Kapikian A.Z., Chanock R.M. (1981). "Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2". Infection and Immunity, 33(3), 958-961.
5. Lavazza A., Pascucci S., Gelmetti D. (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. Vet Rec, 126(23), 581.
6. Pascucci S., Gelmetti D., Sironi G., Lavazza A. (1989). "Sindromi enteriche dei volatili da reddito: esperienze di campo e rilievi di microscopia elettronica". Atti della giornata di studio su: "Chicken Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili", Brescia, 23 giugno 1989. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, pp. 55-87.
7. Redon, P., Tournut, J. (1973). "L'enterite transmissible du jeune perdreau". Revue de Médecine Vétérinaire, 124 (6), 743-756.
8. Todd D., Mc Nulty M.S., Allan G.M. (1980). "Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Avian Rotavirus RNA". Archives of Virology, 63, 87-97
9. Todd D., Mc Nulty (1986). "Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels". Avian Pathology, 15, 149-159.

Figura 2. Microfotografia elettronica di rotavirus
Figure 2. Microphotograph of rotavirus particles

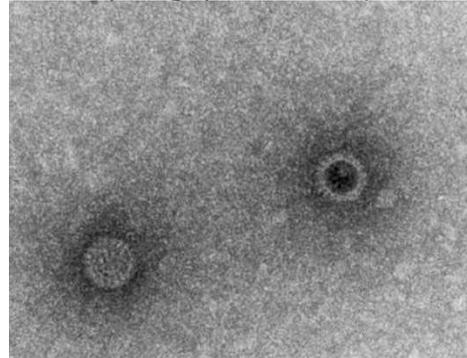


Figura 3. Elettroferotipo di rotavirus da starna (campione 508/02)

Figure 3. Electropherotype of rotavirus from grey partridge (sample 508/02)

