

CRITICITÀ DELLA DIAGNOSI MOLECOLARE PER LA BRONCHITE INFETTIVA AVIARE

Fortin A.¹, Cecchettin K.¹, Drago A.¹, Leardini S.¹, Marciano S.¹ e Terregino C.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD)

Summary

Infectious bronchitis virus (IBV) is the causative agent of a highly contagious disease that results in severe economic losses to the global poultry industry. By reason of this economic importance it is crucial to use effective diagnostic methods. IBV exists in a wide variety of genetically distinct viral types, which increases the importance of choosing appropriate molecular methods for diagnostic use. In addition to genetics issues, there are other factors that influence diagnostic results, such as the characteristics of the virus, the use of live vaccines, the presence in the sample of multiple viral strains of different origin and characteristics, sample quality and different sensitivity and specificity of the available diagnostic methods. In this paper we face the most relevant laboratory problems, and we provide some suggestions for a correct diagnostic approach.

INTRODUZIONE

La Bronchite Infettiva aviaria (IB) è una malattia virale diffusa in tutto il mondo, secondaria come impatto economico per l'industria avicola solamente all'influenza aviaria. È caratterizzata da alta morbilità e capacità di trasmettersi rapidamente tra allevamenti diversi.

Il virus della Bronchite Infettiva è un coronavirus e, come tutti i virus a RNA, presenta un alto grado di diversità genetica che deriva da un'alta frequenza di mutazioni e ricombinazioni che danno vita a differenti genotipi virali con caratteristiche patogenetiche e biologiche differenti.

Il genoma dei coronavirus è il più grande genoma non-segmentato tra i virus a RNA attualmente conosciuti ed è costituito da un singolo filamento di RNA lineare, approssimativamente di 27.5-28 Kbp di lunghezza, a polarità positiva (ssRNA+) che, combinandosi con il capsid, forma un nucleocapsid a simmetria elicoidale. Il genoma è suddivisibile in *open reading frame* (ORF) che hanno il compito di codificare un complesso di proteine strutturali (per esempio S, E, M, N) e non-strutturali (per esempio NSPs 2-16, 3a, 3b, 5a, 5b). La glicoproteina S è costituita da una serie ordinata di due subunità: l'estremità N-terminale (S1 di 520 amminoacidi) che svolge una funzione di legame al recettore cellulare e l'estremità C-terminale (S2 di 625 amminoacidi) che permette la fusione con la membrana e il rilascio del virus nel citoplasma.

Come prevedibile, in funzione del suo ruolo biologico e della posizione nella struttura virale, questa proteina rappresenta anche il principale target della risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata. Rappresenta infatti il principale epitopo immunostimolante e neutralizzante. Questa alta pressione selettiva giustifica l'estrema variabilità della proteina S. Per classificare il virus della Bronchite Infettiva sono stati proposti vari metodi: i più comuni prendono in considerazione il sierotipo e il genotipo.

- *Classificazione in sierotipi*: tradizionalmente i sierotipi sono stati identificati per mezzo test di neutralizzazione su uova embrionate di pollo o di inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

- *Classificazione in genotipi*: per la classificazione si utilizza la tecnica della *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) al fine di amplificare il gene S o una parte di essa, che viene successivamente sequenziata.

Questo lavoro si propone di fornire una sintesi delle criticità della diagnostica molecolare per l'IB e fornire alcuni suggerimenti per un corretto approccio diagnostico.

PROBLEMATICHE NELLA INDIVIDUAZIONE DEL GENOMA VIRALE

La soluzione maggiormente utilizzata per individuazione generica del virus della IB è l'uso di una metodica di real time RT-PCR (rRT-PCR) grazie alla sua rapidità e sensibilità, che permette di ottenere un esito veloce e risultati robusti, tuttavia la scelta del target da rilevare è cruciale. Questa scelta dipende dall'obiettivo che si vuole raggiungere:

Un target conservato consente la generica identificazione del patogeno e spesso prevede utilizzo di target di dimensioni limitate che diminuiscono anche il numero di falsi negativi legati a problemi di degradazione (*drawbacks*). Questi tipi di positività sono però spesso dei fondi ciechi perché alla diagnosi generica non si accompagna la capacità di genotipizzare.

Un target variabile (S1), invece, consente una rapida identificazione del ceppo ricercato ma spesso si traduce in una riduzione della sensibilità del metodo. Infatti si selezioneranno solo alcune varianti genetiche tralasciandone altre che potrebbero essere presenti ma geneticamente diverse e quindi difficilmente identificabili da un metodo di questo tipo.

Un'altra problematica da considerare sono i frequenti eventi di ricombinazione del virus della bronchite aviaria, che portano a modifiche nella zona di appaiamento dei primers, cosa che potrebbe rendere le metodiche PCR genotipo specifiche meno sensibili o addirittura inefficaci.

PROBLEMATICHE NELLA GENOTIPIZZAZIONE

Prendendo in esame le diverse fasi si possono identificare due punti critici:

- 1) La RT-PCR di amplificazione;
- 2) L'interpretazione della sequenza generata.

RT-PCR di amplificazione

L'alta variabilità del gene S comporta una difficoltà nell'identificazione di zone conservate tra i diversi genotipi adatte al disegno di primers universali per la reazione di amplificazione (fig.1).

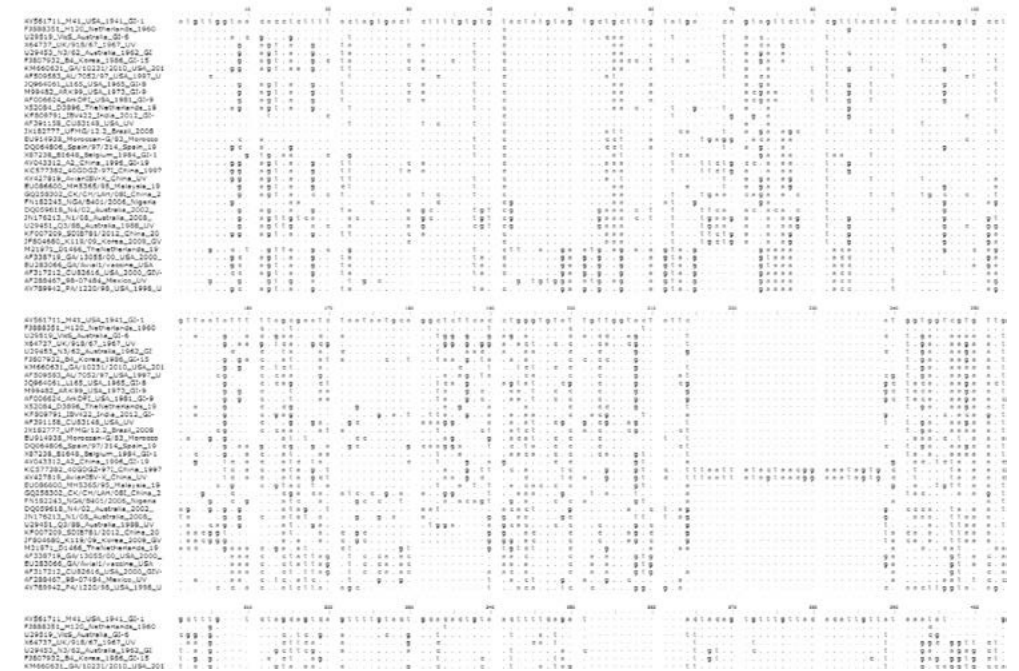


Fig.1 esempio di allineamento della porzione ipervariabile HV1 del gene S1

Per ovviare a questo ci sono alcune possibili soluzioni:

a. *PCR con primers degenerati*

Utilizzare primers contenenti degenerazioni, cioè possibilità di avere per una singola posizione 2 o più nucleotidi, comporta dei rischi, infatti primers troppo degenerati garantiscono un alto spettro di omologie ma una diminuita sensibilità della metodica verso ogni singolo genotipo in quanto nella mix di primers la concentrazione di ogni singola combinazione di nucleotidi è inversamente proporzionale al numero e al tipo di degenerazioni scelte. Viceversa primers poco degenerati sono altamente sensibili verso il genotipo per il quale sono stati disegnati, ma implicano un alto rischio di falsi negativi identificando con performance minori e variabili gli altri genotipi oltre a un alto rischio di comparsa di amplificati aspecifici.

b. *PCR specifiche in zone differenti dello stesso gene*

Impiegare PCR specifiche permette di utilizzare primers poco degenerati, in questo modo si possono genotipizzare un maggior numero di campioni nonostante l'alta variabilità del gene. Con protocolli diversi si possono identificare genotipi diversi, se presenti contemporaneamente nel campione. Ogni PCR, però, ha performance proprie e indipendenti che devono fare i conti con la variabilità intrinseca in ogni genotipo: ciò ha una ricaduta sia sulla specificità che sulla sensibilità del metodo in generale. Infatti avendo come target una zona variabile,

la metodica con primers poco degenerati è per sua natura a rischio di mancato riconoscimento (*mismatches*). Ciò implica che ogni singolo protocollo PCR può mostrare maggiore affinità per alcuni ceppi e meno per altri, inoltre usando PCR differenti si ha un aumento sia di costi che di tempistiche di analisi.

Analisi della sequenza ottenuta dalla RT-PCR

Questa fase consiste innanzitutto nella valutazione della qualità della sequenza ottenuta e, se la qualità è sufficientemente buona, nella conseguente identificazione del genotipo presente nel campione in base alla sequenza ottenuta. Questi due passaggi sono cruciali per ottenere un esito corretto e comprensibile ed entrambi presentano delle criticità date principalmente dalla natura del campione.

Le sequenze sono generate dall'analisi dell'amplificato fornito dalla RT-PCR di tipizzazione e quindi, hanno qualità dipendente dalle performance di quest'ultima: la presenza di amplificati aspecifici di lunghezze diverse e non tipiche del virus ricercato (fig. 2a) compromette molto la possibilità di ottenere una sequenza accettabile. Inoltre è possibile avere una qualità molto bassa della sequenza dovuta alla presenza contemporanea di due o più virus geneticamente simili, per coinfezioni o presenza di vaccini vivi. Questa condizione causa la presenza di "rumore di fondo" nella sequenza e/o la presenza di doppi picchi nell'elettroferogramma con conseguente difficoltà di identificazione del singolo virus (fig. 2b).



Fig2a: esempio di bandeggio aspecifico in PCR **Fig2b:** esempio di elettroferogramma problematico

Un'altra criticità è legata all'attribuzione del genotipo. Questo passaggio si può effettuare tramite confronto della sequenza ottenuta con un database di sequenze certe e/o tramite analisi filogenetica, utilizzando un albero con sequenze di riferimento. In entrambi i casi la criticità maggiore è la nomenclatura dei ceppi. In figura 3 è mostrato un esempio di analisi della similarità di un campione di campo mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). La tabella evidenzia che non sempre la similarità (*ident*) è riferita alla totalità della sequenza S1 del campione (*query cover*), cosa che implica una minore sicurezza nell'assegnazione del genotipo. Inoltre i primi risultati, cioè quelli più affidabili statisticamente, non sempre hanno una nomenclatura chiara e univoca cosa che alla fine comporta un problema nell'identificazione del virus e quindi delle sue caratteristiche biologiche.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Infectious bronchitis virus partial s1 gene for spike glycoprotein, S1 subunit, genomic RNA, isolate RF/05/02	215	215	93%	5e-52	82%	AJ575414.1
Infectious bronchitis virus strain N2-75 spike protein (S), 3a protein (3a), 3b protein (3b), small membrane protein (3c), membrane protein (M), 5a protein (5a), 5b protein (5b), and nucleocapsid (N) genes, complete cds	204	204	93%	1e-48	81%	DQ490208.1
Avian infectious bronchitis virus strain N2/75 S1 glycoprotein gene, partial cds	204	204	93%	1e-48	81%	U29523.1
Infectious bronchitis virus isolate SLO/809/97 spike glycoprotein S1 gene, partial cds	196	196	86%	2e-46	81%	GU246616.1
Infectious bronchitis virus partial s1 gene for spike glycoprotein, S1 subunit, genomic RNA, isolate RF/20/99	196	196	100%	2e-46	80%	AJ575406.1
Infectious bronchitis virus partial s1 gene for spike glycoprotein, S1 subunit, genomic RNA, isolate RF/04/99	193	193	100%	3e-45	79%	AJ575401.1
Infectious bronchitis virus isolate AR/10/BA/30 S1 protein (S) gene, partial cds	187	187	86%	1e-43	81%	KM658253.1
Infectious bronchitis virus strain Cal557 2003, complete genome	187	187	93%	1e-43	80%	FJ904715.1

Fig. 3: esempio di output di BLAST per un campione diagnostico

DISCUSSIONE

Per permettere di identificare correttamente e completamente i virus patogeni della IB responsabili delle problematiche riscontrate in campo, garantendo al tempo stesso un'alta qualità del risultato emesso, non si può sempre adottare un protocollo diagnostico standard ma occorre una procedura flessibile di analisi da concordare con il veterinario aziendale. Per esempio un approccio che garantisce alta affidabilità è l'applicazione consequenziale di più metodiche di amplificazione. Inizialmente si procede con una real time RT-PCR disegnata sulla zona UTR del virus della bronchite infettiva, ossia su una zona scarsamente variabile, in modo da avere la garanzia di identificare il maggior numero di genotipi.

I campioni risultati positivi alla real time RT-PCR vengono poi analizzati con alcune RT-PCR convenzionali che hanno come target il gene S1. Nello specifico la maggior

parte dei campioni possono essere identificati con una metodica one step con primers poco degenerati e, se risultassero negativi, si può eseguire una successiva PCR two steps che aumenta la sensibilità tramite una PCR nested eseguita sul precedente amplificato.

In casi particolari, in base a specifiche realtà di campo, si può procedere con una RT-PCR one step costruita all'inizio del gene S1 che, contenendo numerosi primers poco degenerati, dimostra una specificità differente dalle altre utilizzate che invece sono più ad ampio spettro oppure una o più RT-PCR specifiche per ceppi genotipicamente diversi da tutti gli altri (come il D1466) e quindi difficilmente identificabili con le metodiche più generiche.

L'approccio a processo e non ad analisi può garantire una più ampia possibilità di caratterizzazione, ma non garantisce in ogni caso un successo del 100%, ciò è dovuto a diversi fattori tra i quali i principali sono la qualità del campione all'arrivo in laboratorio e la concentrazione del virus nel campione stesso.

Tra i principali motivi di falsi negativi legati alle caratteristiche del campione si annoverano:

1) *Errata selezione del campione o momento di prelievo*

Nonostante la maggiore sensibilità delle metodiche biomolecolari, sbagliare il campionamento può portare spesso ad un esito negativo dell'esame.

2) *Acidi nucleici degradati*

Campioni prelevati da animali morti da tempo o conservati/trasportati in modo scorretto (temperature elevate per es.), in cui le nucleasi endogene o proteasi esogene (per esempio batteriche) hanno degradato gli acidi nucleici, possono risultare negativi. È sempre raccomandabile, anche per i test biomolecolari, trasportare i campioni refrigerati e nel minor tempo possibile.

3) *Presenza d'inibitori della PCR*

Alcuni campioni come il fegato o le feci sono ricchi di sostanze che inibiscono la PCR, quindi, se è possibile, scegliere altri campioni (tamponi tracheali, tonsille cecali, reni).

Bisogna infine considerare che la scelta di una real time di discriminazione ad ampio spettro con un target molecolare di dimensioni ridotte (121bp), se da un lato garantisce molta copertura, dall'altro espone a individuare dei campioni positivi che hanno una concentrazione di virus eccessivamente esigua per permettere una caratterizzazione del ceppo identificato. Inoltre in campioni mal conservati si presta a riconoscere positività non confermabili da altre metodiche con target di dimensioni superiori e quindi più esposte agli effetti negativi della degradazione. Infine la presenza di più genotipi nello stesso campione spesso genera una sequenza di bassa qualità che non permette l'identificazione dei ceppi virali presenti.

Il problema della nomenclatura non è risolvibile dal laboratorio ma bensì occorrerebbe avere una convenzione internazionale sui nomi dei ceppi. Una proposta in merito è stata fatta da Valastro *et al.*, (2016) che partendo dalle differenze geniche assegna nomi ai genotipi indipendentemente dai sierotipi. Il limite di questo approccio è la necessità di sequenziare l'intera porzione.

In conclusione è bene tener presente che la diagnosi di laboratorio della bronchite infettiva è complicata da numerosi fattori che derivano dalle caratteristiche del virus stesso, in continua evoluzione per la pressione selettiva immunitaria e fenomeni di riassortimento genico, dall'uso di vaccini vivi (a volte poco razionale), dalla

presenza nel campione di più ceppi virali di diversa origine e caratteristiche, dalla qualità del campione e della differente sensibilità e specificità delle metodiche utilizzate. Al fine di avere risposte affidabili e sensate è bene rivolgersi a laboratori esperti che di concerto con i veterinari aziendali sono in grado di mettere in atto le strategie diagnostiche più appropriate e di valutare correttamente i risultati ottenuti in modo da rispondere efficacemente alle problematiche riscontrate in campo.

BIBLIOGRAFIA

Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I.(2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. In: Infect Genet Evol. 349-64.