

COMUNICAZIONE 13**ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DEL VIRUS DELLA LEUCOSI AVIARE****P. Massi, F. Paganelli G. Tosi***Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

Parole chiave: virus della leucosi aviare, sottogruppo J, fibroblasti di embrione di pollo, antigene p27.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF AVIAN LEUKOSIS VIRUS

Key words: avian leukosis virus, subgroup J, chicken embryo fibroblasts, antigen p27.

Summary: a method of detection of avian leukosis virus is described. A study on 15 outbreaks (including meat-type breeders, broilers, layers and cockerels) of neoplastic diseases was conducted. To obtain a differential diagnosis between avian leukosis and Marek's disease a correlation between gross pathology, microscopic lesions and virus isolation is discussed.

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

Introduzione

I virus della leucosi/sarcoma aviare (ALSV) sono retrovirus di tipo C responsabili di una serie di malattie neoplastiche benigne e maligne che colpiscono le specie avicole e, in particolare, il pollo (3). Tali virus presentano un antigene comune, gruppo-specifico, denominato p27 e rilevabile mediante l'impiego di tecniche diagnostiche quali l'ELISA e la fissazione del complemento. Esiste inoltre una glicoproteina dell'envelope virale, chiamata gp85, responsabile della suddivisione degli ALSV nei sottogruppi A, B, C, D, E e J. Al sottogruppo E appartengono i cosiddetti "virus endogeni" il cui DNA è integrato nel genoma delle cellule di quasi tutte le linee genetiche di pollo. Fino a qualche anno fa la forma patogena più comune, causata dai sottogruppi A, B, C, e D, era la leucosi linfoide. Di più recente comparsa è la leucosi mieloide, sostenuta dal sottogruppo J e osservata inizialmente in alcune linee di riproduttori pesanti. Nell'ambito delle malattie neoplastiche si impone pertanto una corretta diagnosi differenziale tra le varie forme di leucosi aviare e la malattia di Marek. Non sempre, infatti, le lesioni macro e microscopiche consentono una diagnosi eziologica certa, considerando anche la possibile concomitanza di entrambe le forme virali. Scopo del presente lavoro è illustrare l'impiego di un importante strumento diagnostico basato sull'isolamento degli ALSV su colture di fibroblasti di embrione di pollo appartenenti ad una linea genetica indenne e resistente ai virus endogeni (1).

Materiali e Metodi

Preparazione delle colture cellulari: sono state allestite colture primarie di fibroblasti di embrione di pollo (CEF) a partire da uova "specific pathogen free" (SPF) appartenenti alla linea genetica 0 fenotipo C/E. Le uova sono state fornite dall'Institute of Animal Health di Compton (UK). Le colture sono state ottenute da embrioni prelevati dopo 10 giorni di incubazione. Dopo la fase di tripsinizzazione le cellule sono state diluite in terreno di crescita HAM'S F10 + M199 supplementato con siero fetale bovino (FCS) 10% (v/v) fino ad ottenere una concentrazione di $2,5 \times 10^5$ cellule/ml. La sospensione cellulare è stata seminata in flasks da 25 cm² che sono state incubate a 37°C, CO₂ 5%. Il monostrato ha raggiunto la completa confluenza in circa 24 ore.

Preparazione dei campioni: Gli organi, sede di lesioni macroscopiche, sono stati prelevati (soprattutto fegato e milza) e successivamente omogeneizzati con

tampone fosfato antibiotato e supplementato con 1% (v/v) di Tween 80.

Infezione delle CEF: trascorse 24 ore dalla preparazione delle CEF il terreno di crescita è stato eliminato e sostituito con un nuovo terreno supplementato con FCS 2% (v/v). Inoltre 400 µl di ogni campione in esame sono stati inoculati in doppio in altrettante flasks; invece 5 flasks sono state inoculate con tampone fosfato antibiotato e 0,1% (v/v) di Tween 80, che sono servite come controllo negativo. Le colture infettate non presentavano effetto citopatico. Trascorsi 9 giorni dall'infezione, sono stati aggiunti ad ogni flask 320 µl di 5% (v/v) di Tween 80, per poi congelare/scongelerare il campione per 3 volte. Il materiale così ottenuto è stato sottoposto ad un'ELISA indiretta (KPL®) per la ricerca dell'antigene p27.

Esami sierologici: in alcuni dei casi osservati gli accertamenti diagnostici sono stati completati dal prelievo di campioni di sangue sottoposti a metodiche ELISA indirizzate alla ricerca dell'antigene p27 (KPL®) e degli anticorpi prodotti nei confronti della gp85 (KPL®).

Risultati e Discussione

I risultati dell'indagine sono riassunti nella tabella 1. Nei due casi in cui è stato ottenuto l'isolamento virale esiste una perfetta corrispondenza tra tale riscontro diagnostico e l'osservazione di lesioni macro (figure 1 e 2) e microscopiche, ritenute indicative o addirittura patognomiche (come ad esempio le neoplasie ossee) nella leucosi mieloide (4). Questi risultati andranno ulteriormente approfonditi attraverso l'identificazione (mediante PCR) del sottogruppo di appartenenza dei ceppi isolati (5). Un altro dato interessante riguarda l'isolamento del virus in un gruppo di broilers a fine ciclo. Finora, infatti, la diagnosi di leucosi mieloide in questa tipologia produttiva si basava solo sul riscontro di lesioni istopatologiche presuntive di tale malattia (2). Infine, dall'indagine vengono confermati i dubbi interpretativi delle prove sierologiche attualmente a disposizione, in particolare per ciò che riguarda la ricerca dell'antigene p27 la cui presenza è da ritenersi ubiquitaria in tutte le linee genetiche allevate.

Bibliografia

1. Fadly A.M., Witter R.L. (1998) "Oncornaviruses: Leukosis/sarcoma and reticuloendotheliosis" in: American Association of Avian Pathologists: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th edition. Kennett Square, PA; 135-142.

- Massi P., Tosi G., Rampin T., Sironi G., Zanella A. (2000) "Liver lesions in broilers from ALV-J infected breeders". In: Kaleta E.F.: Proceedings of international symposium on ALV-J and other avian retroviruses; Rauscholzhausen, Germany, 5-8 June 2000. Institut für Geflügelkrankheiten Justus Liebig University, Giessen, Germany, 192-195.
- Payne L.N., Fadly A.M. (1997) "Leukosis/Sarcoma group" in: Calnek B.W.: Diseases of Poultry 10th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 414-510.
- Payne L.N., Venugopal K. (2000) "Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticulo-endotheliosis". Rev.sci.tech.Off.int.epiz., 19, 544-564.
- Smith L.M., Brown S.R., Howes K., McLeod S., Arshad S.S., Barron G.S., Venugopal K., McKay J.C., Payne L.N. (1998) "Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus". Virus Research, 54, 87-98.

Tabella 1: Riepilogo dei risultati**Table 1:** Summary of the results obtained

Tipo di allevamento ed età	Lesioni macroscopiche	Lesioni microscopiche	Virologico CEF ed ELISA per Ag p27	ELISA su siero per Ag p27	ELISA su siero per Ab gp85
Galline Ovaiole 26w	Granulomi ossei	Granulomi batterici	NEGATIVO	50% POSITIVI	50% POSITIVI
Galline Ovaiole 26w	Neoplasia fegato cuore ovaio cute mesentero	Malattia di Marek	NEGATIVO	30% POSITIVI	50% POSITIVI
Broilers fine ciclo	Sclerosi epatica	Mielociti mieloblasti eterofili	NEGATIVO	N.E.*	N.E.
Riproduttori pesanti 40w	Neoplasia fegato milza, ovaio proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 25w	ovarite	Non reperti di rilievo	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 28w	Neoplasia fegato milza, ovaio proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 28w	Involuzione ovarica	Non reperti di rilievo	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Galline ovaiole	Neoplasia fegato milza	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 46w	Neoplasia fegato e mesentero	Linfociti eterofili mielociti	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Galletti 22w	Neoplasia fegato e proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	30% POSITIVI	10% POSITIVI
Galline ovaiole 26w	Neoplasia fegato e proventriglio	N.E.	NEGATIVO	50% POSITIVI	NEGATIVI
Broilers 43gg	Neoplasia proventriglio	Malattia di Marek	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Broilers fine ciclo	Epatosi	Fibrosi epatica	NEGATIVO	N.E.	N.E.
Riproduttori pesanti 30w	Neoplasia ossea mesentero e pancreas	mielocitomatosi	POSITIVO	10% POSITIVI	5% POSITIVI
Broilers fine ciclo	epatomegalia	mielocitomatosi	POSITIVO	N.E.	N.E.

* N.E.= non eseguito

Figura 1: Mielocitomatosi nei riproduttori pesanti: a) neoplasie sternali, b) neoplasie costali

Figura 2: Mielocitomatosi nei broilers: lesioni epatiche

