

# SVILUPPO DI UN METODO DI PROVA PER L'IDENTIFICAZIONE DI ANTICORPI SIERONEUTRALIZZANTI NEI CONFRONTI DEI *FOWL ADENOVIRUS A* NELLA FARAONA (*NUMIDA MELEAGRIS*)

Terregino C., Toffan A., Grossele B., Leardini S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10 - 35020 - Legnaro (PD)*

## Summary

The Fowl adenovirus A (CELO/Phelps) is the type species of group I avian adenovirus belonging to the genus *Avianadenovirus*. This virus is often associated with specific diseases in guinea fowl, such as viral necrotizing pancreatitis. This work aims to develop a specific analytical method for the detection of neutralizing antibodies against Fowl adenovirus A in the serum of infected guinea fowls, under natural conditions. From the preliminary data so far obtained, it seems that seropositivity detected by seroneutralization assay has a short duration, it develops rapidly, is found only in slightly more than half of reared birds and never reaches very high values; the titer as well decays very quickly.

## INTRODUZIONE

Il ruolo patogeno primario dei *Fowl adenovirus A* (in passato noti come virus *CELO-Chicken Embryo Lethal Orphan*) nel pancreas di faraone (*Numida meleagris*) è stato osservato, per la prima volta a livello mondiale, in Italia da Pascucci *et al.* nel 1970. Gli autori osservarono una forma morbosa a lenta diffusione in gruppi di 9.000 e 1.200 faraone di età compresa tra 12 e 70 giorni. Nel primo gruppo la morbilità era stata del 50% mentre la mortalità del 4% e all'esame anatomo-patologico si osservava ascite, epato-splenomegalia e un pancreas aumentato di volume, di colorito giallastro con aree di varia forma ed estensione giallo-opache o emorragiche.

Charlton *et al.* (1995) descrissero un caso clinico sovrapponibile al precedente in un allevamento di 600 faraone di 21 giorni di età che mostravano anoressia, depressione ed aumento della mortalità. I colleghi americani osservarono istologicamente a livello pancreatico grave necrosi, presenza di fibrina, infiltrazione eteroflica, con numerosi corpi inclusi basofili di grosse dimensioni.

Sempre in Nord America, più precisamente in Canada, Zellen *et al.* (1989) riportarono un episodio di pancreatite da *Adenovirus* in faraone commerciali di due settimane con relativo isolamento virale in uova di pollo SPF.

Il presente lavoro ha l'obiettivo di mettere a punto un metodo analitico per la rilevazione di anticorpi sieroneutralizzanti da siero di faraone infette, in condizioni naturali, da *Fowl adenovirus A*.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Un totale di 94 sieri di faraone di diversa età e provenienza sono stati prelevati

e sottoposti ad analisi presso il Laboratorio di Virologia Speciale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Nello specifico i 94 sieri erano così suddivisi:

- 19 sieri provenienti da riproduttori di 61 settimane (Allevamento A) che non avevano mai manifestato sintomi o lesioni riferibili a pancreatite;
- 23 sieri provenienti dalla progenie di 1 giorno del sopracitato allevamento di riproduttori (Allevamento A-0);
- 9 sieri provenienti di faraone di 37 giorni (Allevamento A-1), progenie del sopracitato allevamento di riproduttori, che avevano presentato casi di pancreatite intorno alle tre settimane di vita;
- 16 sieri provenienti da faraone di 93 giorni (Allevamento A-2), progenie del sopracitato allevamento di riproduttori, che avevano presentato casi di pancreatite intorno alle tre settimane di vita;
- 11 sieri provenienti di faraone di 25 giorni (Allevamento A-3; siero acuto), progenie del sopracitato allevamento di riproduttori, che avevano presentato casi di pancreatite intorno alle tre settimane di vita
- 16 sieri prelevati nello stesso allevamento precedente a 62 giorni di vita (Allevamento A-3; siero convalescente).

#### *Isolamento e identificazione del virus*

Campioni di organo (pancreas in primis) prelevati durante l'episodio di malattia nell'allevamento A-1 ed A-3 sono stati processati per l'isolamento in colture cellulari di epatociti di embrioni di pollo (CEL), esami di microscopia elettronica e test biomolecolari (Pizzuto *et.al.*, 2010).

#### *Ricerca anticorpi sieroneutralizzanti*

I sieri sono stati testati mediante test di sieroneutralizzazione utilizzando come ceppo virale il virus isolato nell'allevamento A-1, cresciuto e titolato in CEL.

Diluizioni in base due dei sieri da testare (50 microlitri) sono state poste in doppio in pozzetti di piastre *microtitre* a fondo piatto. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 microlitri di una sospensione virale contenente 200 TCID<sub>50</sub> dell'adenovirus isolato dal pancreas delle faraone malate. Dopo incubazione per un ora a 37°C, 50 microlitri di una sospensione di CEL sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate per 96 ore e osservate quotidianamente al fine di evidenziare l'effetto citopatico e valutare fino a che diluizione dei sieri in esame ci fosse neutralizzazione della crescita virale.

## **RISULTATI**

La PCR eseguita sui campioni dell'allevamento A1 e A3 prelevati in fase acuta ha evidenziato la presenza di un adenovirus aviare. Il risultato è stato confermato dall'osservazione al microscopio elettronico e all'isolamento su coltura cellulare. L'analisi della sequenza del gene hexon loop 1 ha rivelato la maggiore similarità con la specie *Fowl adenovirus A*.

Le analisi di sieroneutralizzazione eseguite sui sieri dei riproduttori hanno dato esito

negativo su tutti i 19 campioni analizzati. Sui sieri prelevati dagli animali di un giorno, 4 su 23 (17,4%) sono risultati positivi a basso titolo (1:2-1:4).

Dei sieri prelevati a 47 giorni dall'allevamento A-1 un solo siero su 9 analizzati (11%) è risultato positivo con titolo 1:8, e soli due sieri su 16 (12,5%), tra i campioni prelevati nell'allevamento A-2, sono risultati positivi (entrambi con titolo 1:8).

Dei sieri acuti prelevati nell'allevamento A3 sono risultati positivi 6 sieri su 11 (55%). I positivi avevano un titolo compreso tra 1:16 e 1:32.

Dei sieri convalescenti, prelevati 37 giorni dopo dallo stesso allevamento, sono risultati positivi 6 su 16 (circa il 40%) con titoli bassi, tra 1:2 e 1:8.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Questa indagine di campo sulla presenza di anticorpi neutralizzati verso *Fowl adenovirus A* responsabile di pancreatite nella faraona, seppur limitata nei numeri e nel periodo di osservazione, ha permesso di sviluppare un test sierologico specifico per questo agente virale.

Dai primi dati ottenuti sembrerebbe che la positività sierologica in SN per questo virus si sviluppi rapidamente, sia riscontrabile solo in una parte dei soggetti dell'allevamento coinvolto (poco più della metà), non raggiunga mai titoli elevatissimi e che il titolo decada molto rapidamente.

Ancora da chiarire il dato relativo alla debole positività osservata negli animali di 1 giorno di vita in contrasto con l'assenza di anticorpi neutralizzanti nei riproduttori. Rimane, infatti, da capire se riconducibile all'immunità materna, e di conseguenza ad una pregressa infezione dei riproduttori, o a fenomeni di cross reattività aspecifiche. Ulteriori indagini sono necessarie per comprendere meglio la cinetica anticorpale verso *Fowl adenovirus A* nelle varie classi di età e categorie produttive delle faraone.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Charlton BR, Bickford AA. (1995). Gross and histologic lesions of adenovirus group I in guinea fowl. *J Vet Diagn Invest* 7:552-554.
- Pascucci S, Quaglio GL, Maestrini N, Prati A. (1970). Pancreatite da virus CELO nella gallina faraona. *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*. Vol. XXIV, 1970. 667-668
- Pizzuto MS, De Battisti C, Marciano S, Capua I, Cattoli G. (2010). Pyrosequencing analysis for a rapid classification of fowl adenovirus species. *Avian Pathol.* 2010 Oct;39(5):391-8.
- Zellen GK, Key DW, Jack SW. (1989). Adenoviral Pancreatitis in Guinea Fowl (*Numida meleagris*). *Avian Diseases*, Vol. 33, No. 3 (Jul. - Sep., 1989), 586-589.