

DIAGNOSI DI ADENOVIRUS AVIARI TIPO 2 MEDIANTE PCR

PERSIA D., MORENO MARTIN A., PACCIARINI M.L., CERIOLI M., CORDIOLI P., MASSI P., LAVAZZA A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: adenovirus aviari tipo 2, PCR, enterite emorragica, diagnosi virologica

Diagnosis of avian adenovirus type 2 using PCR

Keywords: avian adenovirus type 2, PCR, haemorrhagic enteritis, virological diagnosis

Summary: It is described the use of a new PCR method based on a couple of primers that amplify a 539 bp product, corresponding to a portion of Hemorrhagic Enteritis Virus (HEV) genome located between the endoproteinase gene and the DNA binding protein gene. The results obtained carrying out such test in comparison with Electron Microscopy and the PCR method described by Hess et al. (3) are compared. The samples were obtained either from diagnostic samples of different avian species tested positive in EM for adenovirus or showing lesions referable to adenovirus type 2 infection, as well as from turkeys experimentally infected with HEV. The new PCR method resulted highly sensitive and specific, and it should be considered particularly useful for routine investigations when an adenovirus type 2 is potentially involved as causative agent.

Correspondence: Ana Moreno Martin - Dipartimento Diagnostica Specializzata, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna - Via A. Bianchi, 9 - 25124 Brescia. E-mail: amoreno@bs.izs.it

Introduzione

Gli adenovirus aviari possono essere distinti in tre gruppi (6). Il primo comprende almeno 12 distinti sierotipi "convenzionali", che presentano un antigene comune; Il secondo comprende il virus dell'enterite emorragica del tacchino (HEV), il virus della *marble spleen disease* del fagiano, l'agente della splenomegalia del pollo e della malattia emorragica della faraona. Questi agenti sono sierologicamente distinti da quelli di gruppo 1 ma indistinguibili fra loro, almeno su base sierologica, presentando solo piccole differenze molecolari a livello di DNA. Nel terzo gruppo sono compresi l'agente della EDS 76 isolato da anatra e da pollo, che presenta una parziale cross-antigenicità con i membri del gruppo 1. A differenza degli adenovirus di gruppo 1 e 3 che vengono isolati abbastanza facilmente *in vitro*, su colture cellulari primarie, gli adenovirus di gruppo 2 sono difficilmente isolabili *in vitro*. La diagnosi virologica pertanto può essere effettuata mediante agar gel precipitazione (AGP), poco sensibile e non quantitativa (1) o in ELISA, meno diffusa ma più sensibile (3). Tra gli altri metodi sviluppati, la PCR (2), grazie alla maggiore sensibilità, è utile per la diagnosi di quelle forme sospette che si accompagnano ad un basso titolo virale non svelabile con AGP ed ELISA.

Proprio partendo da quest'ultimo presupposto abbiamo sviluppato un metodo PCR basato sull'utilizzo di primers differenti rispetto a quelli descritti (2), e verificato l'applicabilità diagnostica, tanto in confronto alla microscopia elettronica in colorazione negativa (ME), quanto alla PCR nota e descritta (2), utilizzando sia campioni diagnostici di diverse specie aviari che da tacchini infettati sperimentalmente con HEV.

Materiali e metodi

Campioni: sono stati analizzati 12 campioni provenienti dalla normale attività diagnostica: di questi 5 (2 milze di pollo, 1 feci di tacchino e 2 milze di fagiano) si riferivano a distinti episodi clinici sospetti d'infezione da adenovirus tipo 2, mentre i restanti 7 campioni (2 proventricolo di pollo, 1 fegato di piccione, 2 intestini di piccione, 1 intestino di starna, 1 liquido allantoideo di pollo) sono stati testati in quanto risultati positivi per adenovirus all'esame al ME. Due campioni di milza prelevati da tacchini con differente sintomatologia,

testati anche sierologicamente per HEV con esito negativo sono stati esaminati come controlli negativi. In aggiunta sono stati esaminati campioni prelevati da due gruppi di tacchini, rispettivamente di 7 e 10-11 settimane di età, infettati sperimentalmente per via i.m. con un ceppo patogeno di HEV ottenuto dal Prof. A.M. Fadly (East Lansing, USA). Tale ceppo determina il 40-50% di mortalità e il 100% di morbidità nei tacchini SPF, mentre in tacchini commerciali la mortalità è molto bassa sebbene il virus induca microlesioni e immunosoppressione. (8). Tacchini commerciali di pari età, vaccinati 1 o 2 volte con un vaccino inattivato del commercio e sottoposti quindi a challenge venivano usati come controlli negativi.

Microscopia Elettronica: l'esame al ME in colorazione negativa previa ultracentrifugazione in Airfuge Beckman è stato eseguito adottando la metodica comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZS di Brescia (4).

Tabella 1: Condizioni finali di reazione (25 µl)

Table 1: Final conditions of amplification (25 µl)

MgCl ₂ 1,5 mM, Tris HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM
dNTP 200 µM
Primer sense (HEV 1F o HEV DIR) 0,5 µM
Primer antisense (HEV 2R o HEV REV) 0,5 µM
Taq DNA pol 1,25 U
H ₂ O + DEPC

Tabella 2: Programmi di amplificazione delle reazioni PCR

Table 2: Amplification programmes of the two PCR reactions

amplificazione HEV1F/HEV2R			amplificazione HEVDIR/HEV REV		
95°C	5 min	1 ciclo	95°C	5 min	1 ciclo
95°C	20 sec	40 cicli	95°C	20 sec	40 cicli
52°C	30 sec		60°C	30 sec	
72°C	30 sec	1 ciclo	72°C	30 sec	1 ciclo
72°C	5 min		72°C	5 min	
4°C	∞		4°C	∞	

PCR: l'estrazione del DNA virale era eseguita dai campioni di milza utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Per l'amplificazione erano utilizzati, in alternativa, due PCR basate sull'uso di coppie di primers differenti: quelli pubblicati da Hess (2), che amplificano una porzione del gene "hexon" di 1646 paia di basi, e una coppia di primers, in grado di amplificare un frammento di 539 bp, selezionati tra il gene "endoproteinase" e il gene "DNA binding protein"

(Figura 1), dopo allineamento ed analisi delle sequenze dei principali adenovirus aviari e mammiferi presenti in banca dati. La reazione di amplificazione era eseguita a partire da 2µl di prodotto di estrazione, alle condizioni finali indicate in tabella 1; per ciascuna delle due reazioni si seguivano il programma di amplificazione riportato in tabella 2. Gli amplificati venivano fatti correre in elettroforesi su gel di agarosio al 1,2% e 1,8% rispettivamente per la prima e seconda reazione PCR, e colorati in bromuro di etidio.

Figura 1: Rappresentazione schematica dell'organizzazione del genoma di HEV con indicate le sequenze e le posizioni dei primers utilizzati nelle due reazioni PCR

Figure 1: Schematic representation of the genome organization of HEV, with indication of the two couples of primers used for the different PCRs and characteristics of the amplified products

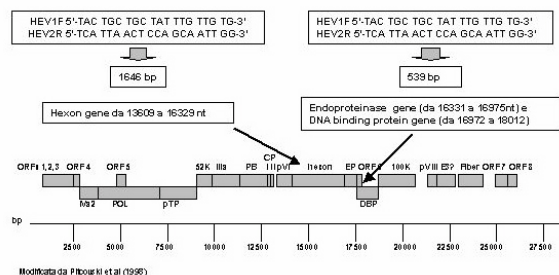


Tabella 3: Risultati dei campioni diagnostici

Table 3: Results obtained from diagnostic samples

Prot.N.	Mat.	Specie	M.E.	PCR 1664bp	PCR 539bp
1378/00	feci	tacchino	+	neg	+
81396/02	milza	pollo	neg	neg	+
81405/02	milza	pollo	++++	+	+
81417/02	milza	tacchino	++++	+	+
84503/02	milza	fagiano	neg	neg	+
520/98	provent.	pollo	+++	neg	neg
771/98	provent.	pollo	+++	neg	neg
1057/98	fegato	piccione	+++	neg	neg
1164/99	intestino	piccione	++	neg	neg
1598/01	liq.allan.	pollo	+	neg	neg
1314/01	intestino	starna	+	neg	neg
1317/01	intestino	piccione	++	neg	neg
120036/02	milza	tacchino	neg	neg	neg
138902/02	milza	tacchino	neg	neg	neg

Tabella 4: Tacchini infettati sperimentalmente

Table 4: Results from experimental infected turkeys

età	n. animali	Marmorizzazione.	M.E.	PCR 1664bp	PCR 539bp
7 sett	1	+	+	+/-	+
	10	++	+	+/-	+
	4	+++	+	+/-	+
10-11 sett	11	neg	neg	neg	+

Risultati e Discussione

I risultati ottenuti sono riassunti nelle tabelle 3 e 4. Il test PCR 1664bp è risultato avere una sensibilità pressoché sovrapponibile alla ME, con l'unica eccezione del campione di feci 1378/00 risultato debolmente positivo in ME e negativo alla PCR. Di contro la PCR 539bp è risultata altamente sensibile, fornendo risultato positivo in tutti i casi di positività al ME, ma permettendo anche di giudicare come positivi i campioni diagnostici di milza di pollo (81396/02) e di milza di fagiano (84503/02) negativi agli altri due metodi. La specificità della PCR 539bp è provata, oltre che dalla negatività verso i più comuni adenovirus di mammiferi, testati in fase di approntamento della metodica (dati non presentati), sia dalla negatività

verso altri adenovirus evidenziati alla ME in campioni diagnostici e considerabili, in base ai casi clinici e/o alle caratteristiche di isolamento, come appartenenti al gruppo 1. Per quanto riguarda i tacchini infettati sperimentalmente, mentre nei soggetti di 7 settimane di età erano evidenti lesioni macroscopiche (milza marmorizzata ed in alcuni enterite emorragica e feci diarroiche), con conseguente esito positivo dell'esame al ME, nei soggetti di età maggiore l'esame anatomo-patologico ha evidenziato un aumento molto evidente del volume della milza che, però, non presentava aspetto marmorizzato. In un solo soggetto è stata evidenziata diarrea, ed enterite catarrale. Gli esami al ME hanno dato esito costantemente negativo.

Conclusioni

Il metodo PCR 539bp si è mostrato maggiormente sensibile rispetto al test PCR 1664bp (2); questo si spiega con la maggior facilità ad ottenere prodotti amplificati di peso molecolare <800bp. Tale maggior sensibilità, unitamente all'elevata specificità, la fanno ritenere un valido strumento di diagnosi, anche nel caso di impiego routinario. In particolare, rispetto agli altri metodi testati (ME e PCR 1664bp) la PCR 539bp sembra utile a svelare, nel tacchino, infezioni subcliniche da virus HEV o non caratterizzate da lesioni spleniche ed intestinali evidenti. Quanto osservato nel corso dell'infezione sperimentale di tacchini di maggiore età (10-11 sett.), ovvero semplice aumento del volume della milza ma assenza di marmorizzazione ed enterite, è del resto in accordo con quanto riportato da Meteyer et al (5) che hanno osservato relazioni statisticamente significative tra l'età dei soggetti e le lesioni alla milza. Altrettanto utile potrebbe essere tale metodo nella diagnosi di forme da adenovirus 2 nel fagiano, solitamente però ben caratterizzate dal punto di vista clinico con lesioni e mortalità evidenti, ma anche e soprattutto nel pollo e nella faraona, nelle quali viceversa l'infezione può assumere spesso andamento subclinico.

Bibliografia

- Domermuth C.H., Gross W.B., DuBose R.T. (1973). Microimmunodiffusion test for haemorrhagic enteritis of turkeys. Avian Dis., 17: 439-444.
- Hess M., Raue R., Hafez H.M. (1999). PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. J. Virol Meth., 81: 199-203.
- Hurk van den J. (1986) Quantitation of haemorrhagic enteritis virus antigen and antibody using enzyme-linked immunosorbent assays. Avian Dis., 30: 662-671
- Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D. (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. Vet. Rec., 126: 581.
- Meteyer C.U., Mohammed O., Chin R.P., Bickford A.A., Trampel D.W. and Klein P.N. (1992). Relationship between age of flock seroconversion to hemorrhagic enteritis virus and appearance of adenoviral inclusions in the enteritis and renal tubule epithelia of turkeys. Avian Dis., 36: 88-96.
- Pierson F.W. and Domermuth C.H. (1977). Haemorrhagic enteritis and related infections. In. Disease of poultry, 10th ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDouglas, Y.M. Saif (eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 624-632.
- Pitcovski J., Mualem M., Rei-Koren Z., Krispel S., Shmueli E., Peretz Y., Gutter B., Gallili G.E., Michael A., Goldberg D. (1998). The complete DNA sequence and genome organization of the avian adenovirus, hemorrhagic enteritis virus. Virol., 249: 307-315.
- Rautenschlein S., Sharma J.S. (2000). Immunopathogenesis of haemorrhagic enteritis virus (HEV) in turkeys. Dev. Comp. Immunol., 24: 237-246.