

**DIAGNOSI DI MALATTIE ENTERICHE VIRALI NEL TACCHINO MEDIANTE MICROSCOPIA ELETTRONICA ED IDENTIFICAZIONE DI CORONAVIRUS IN UN CASO DI ENTERITE**

**A. MORENO MARTIN<sup>1</sup>, L.J. VINCO<sup>2</sup>, P. CORDIOLI<sup>1</sup>, A. LAVAZZA<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia*

<sup>2</sup>*Gruppo Bignami S.p.A. Produzioni Avicole, Anzola dell'Emilia (Bologna)*

Parole chiave: tacchino, virus, microscopia elettronica, diagnosi, enterite, coronavirus

**Diagnosis of turkey viral enteric diseases by electron microscopy and identification of coronavirus in a case of turkey enteritis**

Key words: turkey, diagnosis, virus, coronavirus, electron microscopy, enteritis

Summary: The negative staining electron microscopy techniques are widely used at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) in Brescia as diagnostic tools to detect viral infections of all animal species. In the EM Laboratory of the ISZLER around 3000 samples are examined each year and around 25-30% are from avian species. The most common methods used are the Airfuge techniques based on the use of Beckman Airfuge. In this paper we firstly estimate the prevalence of different viruses, identified by negative contrast electron microscopy, on faecal and gut samples taken from 1-5 week old turkeys suffering from enteric diseases, summarising the activity of the laboratory during the period 1994-2001 (260 samples). By EM we observed the presence of viral particles in 51,2% of the samples examined; rotavirus was identified in 26.3%, astrovirus in 23.1%, enterovirus-like in 10.0%. The second goal of this work is to report the identification of a Coronavirus, probably for the first time in Italy, from the intestinal contents of 82 day-old commercial turkeys during an outbreak of enteritis occurred in January 2000. In conclusion we summarise the advantages and disadvantages of negative staining EM and discuss the cause of false negative results when used to diagnose viral diseases of turkeys.

Correspondence: Antonio Lavazza, Lab. Electron Microscopy, IZSLER, Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia (Italy). Tel. +39 30 2290298 Fax +3930 2425251 email: alavazza@bs.izs.it

**Introduzione**

Le tecniche di microscopia elettronica in colorazione negativa sono impiegate come strumenti diagnostici di identificazione di virus in tutte le specie animali. La ME consente di effettuare rapidamente una diagnosi quando la malattia è sostenuta da virus non coltivabili, identificare infezioni virali multiple o virioni non replicabili (immunocomplessati). In medicina veterinaria rende anche possibile fare diagnosi quando nessun'altra metodica è disponibile, e ciò è spesso la regola per alcune specie "minori" o specie selvatiche come pure per alcune malattie avicole meno comuni (2,3,5). Nel laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia vengono esaminati circa 3000 campioni ogni anno e circa il 25-30% di questi provengono da specie avicole. Le tecniche più comunemente usate che comprendono anche la immunoelettromicroscopia e l'immuno-gold sono basate sull'utilizzo dell'ultracentrifuga Beckman Airfuge. Questi metodi dimostrano un buon grado di sensibilità (limite di detectabilità = 10<sup>4</sup> particelle/ml) paragonabile ad un test in ELISA.

**Materiali e Metodi**

**Campioni:** Durante il periodo 1994-2001, 260 campioni intestinali e fecali originati da focolai di enterite in tacchini commerciali verificatisi principalmente in allevamenti del Nord Italia sono stati conferiti al laboratorio di Microscopia elettronica dell'IZSLER di Brescia. Gli animali conferiti avevano un'età compresa tra 1 e 5 settimane e presentavano sintomatologia enterica caratterizzata principalmente da ritardata crescita, depressione, feci molli e/o diarrea. Nel Gennaio 2000 all'IZSLER di Brescia sono stati conferiti per analisi virologica campioni di contenuto cecale ed intestinale di tacchini commerciali di 82 giorni di età. Gli animali provenivano da un allevamento di 8000 capi di età unica situato nel nord Italia ed apparivano depressi, anoressici con perdita di peso e feci molli, ma la mortalità era del tutto trascurabile. I sintomi clinici perdurarono per circa 4 settimane e la perdita di peso iniziale non venne più recuperata. Al carico gli

animali erano sottopeso di 1,5 kg e l'indice di conversione 2,8 cioè 0,3-0,4 punti superiori alla media del periodo. I tratti intestinali erano pallidi, dilatati con contenuto mucoso ed alimento parzialmente indigerito. La lettiera era difficilmente gestibile come conseguenza della diarrea.

**Microscopia elettronica:** I campioni sono stati allestiti utilizzando la metodica Airfuge comunemente in uso presso il Laboratorio di ME dell'IZSLER di Brescia (4) 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. L'esame di immuno-elettromicroscopia (IEM) era eseguito su tutti i campioni. Il metodo consisteva nell'incubare il campione con un pool di sieri, provenienti da tacchini convalescenti, prelevati 20 gg dopo un episodio clinico di enterite causato da rota e astrovirus. Per l'identificazione del coronavirus del tacchino si è utilizzato lo stesso metodo impiegando un siero specifico iperimmune, fornito dal Prof Y.M. Saif (Ohio, USA).

**Risultati**

Tramite EM e IEM si è visto la presenza di particelle virali nel 51,2% dei campioni esaminati; rotavirus è stato identificato nel 26,3%, astrovirus nel 23,1%, enterovirus-like nel 10,0%. Sporadicamente è stata riscontrata anche la presenza di parvovirus-like, adenovirus e rod-shaped virus-like particules (RSVLP). I dati completi vengono riportati in tabella 1. La positività media risultava 51,2%. Il range di positività andava da 14,2 e 90,9% ed anche negli ultimi quattro anni, quando si è avuto un sensibile incremento di conferimenti, è stata riscontrata una positività virale sempre leggermente superiore al 50%. Si è spesso osservata (41 casi) la contemporanea presenza nello stesso campione di due diversi virus in associazione. L'associazione rotavirus più astrovirus era l'associazione riscontrata con maggior frequenza (31 casi), sottolineando il loro ruolo patogeno e la loro

importanza quali agenti primari di enterite (Tabella 2). Il secondo obiettivo di questa presentazione è di segnalare la identificazione di coronavirus probabilmente per la prima volta in Italia, in contenuti intestinali di tacchini commerciali di 82 giorni di età durante un caso di enterite occorsa nel gennaio 2000. L'indagine di ME dei contenuti intestinali, raccolti dagli animali con sintomatologia clinica, ha rivelato la presenza di particelle virali con morfologia tipica dei coronavirus. La immunoelettromicroscopia condotta impiegando un antisiero policlonale positivo nei riguardi dei coronavirus ha rivelato la presenza di aggregati di particelle virali confermando così la presenza di coronavirus (Figura 1).

#### Discussione

La ME in colorazione negativa è un valido aiuto nella diagnosi di malattie enteriche virali del tacchino. Potrebbe essere consigliato particolarmente quando non siano disponibili o impiegabili metodi standard di diagnosi virale. In particolare la microscopia elettronica diretta e la immunoelettromicroscopia sono particolarmente utili per diagnosi rapide fornendo la possibilità di avere una risposta in 3-4 ore. L'indagine condotta con diagnosi in ME ha sottolineato un'alta prevalenza di virus in animali di 1-5 settimane di età con enterite (oltre il 50%) ed ha confermato l'importanza ed il ruolo primario di rotavirus e astrovirus. Come già descritto da vari autori (7) sono stati rinvenuti spesso in associazione cioè 31 volte che corrisponde ad oltre il 50% delle positività per ognuno dei 2 virus. Questo risultato indica un effetto sinergico nel causare enterite nei tacchinotti. Sporadicamente abbiamo rilevato piccoli virus (parvovirus-like o circovirus-like), ma sono necessari ulteriori studi per poter chiarire la natura ed il ruolo patogeno di questi virus. L'enterite da coronavirus è una malattia acuta altamente contagiosa dei tacchini di tutte le età, particolarmente di animali giovani. Per molti anni il

coronavirus del tacchino è stato isolato solo negli Stati Uniti e successivamente anche in Canada (6), paesi in cui causa gravi danni economici all'industria avicola, legati principalmente alla mancata uniformità del gruppo ed al peggioramento dell'indice di conversione. Recentemente in GB è stata descritta l'identificazione di un coronavirus nel contenuto intestinale di tacchinotti, che rappresenta la prima descrizione di un caso di coronavirus in tacchini in Europa (1). In Italia sebbene la sua presenza sia già stata sospettata in precedenza (4 casi dubbi nel 1999), questa è la prima identificazione confermata dell'agente eziologico.

#### Bibliografia

1. Cavanagh D., Mawditt K., Sharma M., Drury S.E., Ainsworth H.L., Britton P., Gough R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology*, 30, 355-368.
2. Gibbs E.P.J., Smale C.J., Voyle C.A., (1980). Electron Microscopy as an aid to the rapid diagnosis of virus diseases of veterinary importance. *Veterinary Record*, 106, 451-458.
3. Gough R.E., Alexander D.J., Collins M.S., Lister S.A., Cox W.J. (1988). Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. *Avian Pathology*, 17, 893-907.
4. Lavazza A, Pascucci S, Gelmetti D: (1990). Rod-shaped virus-like particles in intestinal contents of three avian species. *Vet Rec*, 126: 581
5. Mc Nulty M.S., Curran W.D., Todd D., Mc Nulty J.B. (1979). Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. *Avian Pathology*, 8, 239-247.
6. Nagaraya K.V. & Pomeroy B.S. (1997) Coronaviral Enteritis of turkeys (Bluecomb Disease). In Barnes H.J. Chapter 27, Viral Enteric infections. In B.W. Calnek, (Ed.), *Diseases of Poultry* 10<sup>th</sup> edn (pp. 686-692). Ames: Iowa State University Press.
7. Reynolds D.L. (1997). Astrovirus Infections. In Barnes H.J. Chapter 27, Viral Enteric infections. In B.W. Calnek, (Ed.), *Diseases of Poultry* 10<sup>th</sup> edn (pp. 701 -705). Ames: Iowa State University Press.

**Tabella 1:** Distribuzione della positività virale per anno e tipo di virus

**Table 1:** Distribution of viral positivity for year and type of virus

Anno	N°	Negativo	Rotav.	Astrov.	Enterolike	Parvolike	Adenov.	RPSLV	Coronav.	Ass.								
1994	14	12	85.8	1	7.1	0	0	1	7.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1995	11	1	9.1	3	27.3	4	36.4	3	27.3	2	18.2	0	0	0	0	0	0	2
1996	7	1	14.3	0	0	3	42.8	3	42.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	26	17	65.4	7	26.9	2	7.7	2	7.7	0	0	0	0	0	0	0	0	2
1998	49	28	57.1	10	20.4	16	32.6	3	6.1	1	2.0	0	0	0	0	0	0	9
1999	48	23	47.9	11	20.1	13	27.1	2	4.1	0	0	2	4.1	0	0	4	8.3	7
2000	41	19	46.3	14	34.1	10	24.4	0	0	4	9.7	1	2.4	2	4.9	1	2.4	9
2001	64	26	40.6	22	34.4	14	21.8	12	18.7	2	3.1	0	0	0	0	0	0	12
<b>Total</b>	<b>260</b>	<b>127</b>	<b>48.8</b>	<b>68</b>	<b>26.2</b>	<b>62</b>	<b>23.1</b>	<b>26</b>	<b>10.0</b>	<b>9</b>	<b>3.4</b>	<b>3</b>	<b>1.1</b>	<b>2</b>	<b>0.7</b>	<b>5</b>	<b>1.9</b>	<b>41</b>

**Tabella 2:** Infezioni multiple osservate alla ME

**Table 2:** Multiples infections observed at EM

Tipo di associazione	94	95	96	97	98	99	00	01	Tot.
Rota + Astro				1	7	7	6	10	31
Rota + Enterolike		2		1	1		1	1	6
Rota + Parvolike							1		1
Astro + Parvolike								1	1
Enterolike + Parvolike					1				1
Adeno + Parvolike							1		1
<b>Totale</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>41</b>

**Figura 1:** Particelle di coronavirus immunoaggragate mediante l'utilizzo di antisiero policlonale specifico.

**Figure 1:** Coronavirus particles immunoaggregated using a polyclonal specific antiserum.

