

## TRASMISSIONE VERTICALE: UNA POSSIBILE VIA DI INFEZIONE PER I CIRCOVIRUS?

Circella E., Marino M., Caroli A., Legretto M., Pugliese N., Camarda A.

*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S. P. per Casamassima km. 3, 70010, Valenzano, Bari.*

### Summary

In this study, the possibility of the vertical transmission of *Circovirus* was investigated in a flock of infected Gouldian finches. The detected virus was previously classified as a *BFDV* strain by sequence analysis. Eggs were collected in the flock for three subsequent reproductive seasons. The DNA virus was found in the eggs only in the first reproductive season. 24,39 % of the tested eggs resulted positive. *Circovirus* DNA was detected in yolk while all samples of glair tested negative. The findings strongly suggest that the vertical transmission of *circovirus* is possible. Nevertheless, it seems to occur only in the first year of the outbreak.

### INTRODUZIONE

La famiglia *Circoviridae* comprende attualmente due generi, *Gyrovirus* e *Circovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses). I virus appartenenti al genere *Circovirus* sono di ridotte dimensioni, non presentano *envelope* e possiedono un genoma circolare a DNA a doppio filamento delle dimensioni approssivamente di 2 kb (Niagro et al., 1998, Todd et al. 2004; Varsani et al., 2010).

Tra i mammiferi, le infezioni da *Circovirus* sono state associate a manifestazioni cliniche nel suino (Allan and Ellis, 2000; Ellis et al. 1999), nei cani (Li et al. 2013; De Caro et al. 2014) e, recentemente, in visoni affetti da patologia enterica (Lian et al. 2014). Tra i volatili, il circovirus più noto è il responsabile della malattia del becco e delle penne (*Beak and Feather Disease Virus - BFDV*) dei pappagalli, caratterizzata da immunodepressione e da tipiche alterazioni del becco e del piumaggio (Todd, 2000).

*Circovirus* è stato identificato in numerose altre specie di volatili non psittaciformi, tra cui i piccioni (Duchatel et al., 2006; Todd et al. 2008), lo struzzo (Shivaprasad et al. 1993; Eisenberg et al. 2003), l'oca (Chen et al. 2003; Yu et al. 2007), il cigno (Halami et al. 2008), l'anatra (Smyth et al., 2005; Zhang et al. 2013), il gabbiano (Twentyman et al, 1999), il corvo australiano (Stewart et al, 2006), lo storno (Dayaram et al, 2013), il canarino (Todd et al., 2001; Phenix et al., 2001; Rampin et al., 2006), ed il diamante di Gould (Shivaprasad et al., 2004). Le manifestazioni cliniche e le lesioni indotte dal virus non sono tuttavia costanti e sovrapponibili nelle diverse specie. D'altro canto anche nei pappagalli, in cui *circovirus* è di solito associato alla Malattia del becco e delle penne, l'infezione può evolvere a volte senza sintomi specifici evidenti (Circella et al. 2012; Todd et Gortazar, 2012). Le diverse evoluzioni dell'infezione così come la gravità sembrano poter essere influenzate da numerosi fattori tra cui la specie colpita, l'età degli animali, il livello di anticorpi materni, i diversi stipiti virali coinvolti nell'infezione, la dose infettante e la co-

presenza di altri agenti patogeni (de Kloet et de Kloet, 2004).

Analogamente, anche alcuni aspetti epidemiologici dell'infezione non sono del tutto chiari. E' noto che l'infezione si trasmetta per via orizzontale attraverso l'assunzione, sia in maniera diretta che indiretta, del virus diffuso dagli animali infetti con le desquamazioni cutanee, le penne, le feci e il rigurgito, il quale può favorire infezioni molto precoci dei soggetti recettivi, già in fase di nidiacei (Gerlach, 1994; Todd 2004).

Tuttavia, l'evenienza di una trasmissione verticale dell'infezione è stata ipotizzata già diversi anni fa, in seguito a prove sperimentali che hanno portato ad evidenziare l'insorgenza dell'infezione in nidiacei di pappagallo nati in incubatrice, e pertanto senza aver avuto un contatto diretto con i riproduttori positivi al virus (Gerlach, 1994). Gli studi in proposito ad oggi sono ancora scarsi e frammentari.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare la trasmissione verticale del virus in un gruppo di volatili in corso di infezione naturale da *circovirus*.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamento oggetto dello studio*

Lo studio è stato condotto in un gruppo di Diamanti di Gould, in cui era stata diagnostica un'infezione da *circovirus* le cui caratteristiche genetiche consentivano di classificarlo come ceppo *BFDV* (Circella et al. 2014). Il gruppo di volatili era costituito da cinque coppie di riproduttori di età compresa tra i 2 e i 3 anni, al momento dell'insorgenza dell'infezione. Nei riproduttori erano state osservate alterazioni evidenziabili già macroscopicamente, quali allungamenti e insorgenza di rugosità e deformità, a carico del becco, sovrapponibili alle lesioni osservabili in corso di PBF (Psittacine Beak and Feather Disease) nel pappagallo. L'indagine per verificare la possibilità di una trasmissione verticale dell'infezione è stata condotta per tre differenti stagioni riproduttive. Nel corso di ciascun periodo, le uova da esaminare sono state raccolte direttamente dai singoli nidi entro pochi giorni dalla deposizione. Sono state successivamente trasportate in condizioni di refrigerazione presso la sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Bari per le indagini.

In totale, sono state raccolte 119 uova, provenienti dai differenti nidi, come riportato nella tabella 1. Ciascun uovo è stato sottoposto alla disinfezione del guscio con alcool etilico. Asetticamente, si è provveduto a raccogliere separatamente i campioni di tuorlo e albume. Solo in tre casi, è stata evidenziata la presenza di un embrione di pochi millimetri.

### *Estrazione del DNA, PCR, clonaggio e sequenziamento*

L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando kit Eurogold Tissue Mini Kit (EuroClone, Milano, Italia) secondo le indicazioni della casa produttrice. La ricerca del virus è stata condotta in PCR, utilizzando primers DCiVf/DCiVr (Todd et al., 2001), che amplificano una regione del gene *rep*. Tre ampliconi generati da tre differenti uova sono stati clonati, sequenziati, assemblati ed allineati. Essendo identici tra loro, solo uno è stato allineato con il segmento corrispondente del gene *rep* del *circovirus* identificato nei riproduttori, in GenBank con numero di accesso

JX131620, e con un pannello rappresentativo di *circovirus*: *Porcine Circovirus* (PCV1 - U49186; PCV2 - AF055392), *Canary Circovirus* (CaCV - AJ301633), *Columbid Circovirus* (CoCV - AF252610), *Finch Circovirus* (FiCV - DQ845075) e BFDV (AF311299 Tha; FJ685979 Csu; EF457975 Nho; AY521238 Per; AY521235 Aro).

## RISULTATI

L'analisi delle sequenze ottenute ha evidenziato la piena identità a livello nucleotidico tra il virus identificato nelle uova e lo stipite BFDV proveniente dai riproduttori. *Circovirus* è stato identificato nelle uova solo durante la stagione riproduttiva corrispondente all'anno in cui si è verificata l'infezione, e quindi durante il primo periodo considerato (tabella 1).

Nei due anni successivi, nonostante la positività dei riproduttori al virus a livello delle penne, *circovirus* non è stato riscontrato nelle uova. Nella prima stagione riproduttiva (2011), la percentuale di positività delle uova è risultata in totale pari a 24.39 % (10/41) (tabella 3). Le uova positive venivano riscontrate nei nidi n. 1, 2 e 3. Le uova prelevate dal nido 4 e dal nido 5 sono risultate sempre negative.

In tutti i casi di positività, il virus veniva evidenziato nel tuorlo, mentre i campioni di albume sono risultati costantemente negativi.

Tabella 1. Uova esaminate e riscontro nei tuorli di positività in PCR per *Circovirus*

Periodo	Nido 1		Nido 2		Nido 3		Nido 4		Nido 5		Totale	
	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%	Pos (N°)	%
2011	4 (9)	44.4	2 (8)	25	4 (8)	50	0 (9)	0	0 (7)	0	10 (41)	24.39
2012	0 (15)	0	0 (6)	0	0 (10)	0	0 (14)	0	0 (8)	0	0 (53)	0
2013	0 (6)	0	0 (2)	0	0 (6)	0	0 (5)	0	0 (6)	0	0 (25)	0
Totale	4 (30)	13,3	2 (16)	12,5	4 (24)	16,6	0 (28)	0	0 (21)	0	10 (119)	8,4

Pos = numero uova positive    N° = numero uova esaminate    % = percentuale di positività

## DISCUSSIONE

Il riscontro di *circovirus* nelle uova sembra evidenziare una trasmissione del virus anche per via verticale nel gruppo colpito dall'infezione. Non è da escludere tuttavia che la positività delle uova possa esser dovuta ad una penetrazione del virus all'interno dell'uovo attraverso i pori del guscio, analogamente a quanto si verifica in caso di altri patogeni, spesso di origine batterica. In questo caso, tuttavia, ci si aspetterebbe la positività in PCR anche dei campioni di albume che, per le caratteristiche strutturali dell'uovo, verrebbe in contatto con il virus per primo rispetto al tuorlo. Inoltre, è possibile che nell'albume il virus possa giungere

anche in seguito a contaminazione, per via ascendente dalla cloaca, dell'ovidutto e successivamente dell'albume durante la sua formazione in questo distretto. Precedenti ricerche effettuate nella cocorita (*Melopsittacus undulatus*) (Rahaus et al., 2008) hanno evidenziato la presenza del virus in 6 di 17 (35,3 %) campioni di albume esaminati, mentre i corrispondenti campioni di tuorlo sono risultati costantemente negativi. Analogamente, in ricerche condotte nell'anatra (Li et al., 2014) sulle modalità di trasmissione di DuCV1 e DuCV2, i virus venivano evidenziati, in caso di uova non embrionate, esclusivamente nell'albume, anche se in bassa percentuale (3,75%). In entrambe le ricerche, *circovirus* veniva rilevato in PCR nelle uova embrionate, in percentuali variabili dal 6,67 % (Li et al., 2014) al 20 % (Rahaus et al., 2008). Gli Autori sostenevano pertanto che per supportare questa modalità di trasmissione fosse determinante la presenza dell'embrione.

Nella presente ricerca, in tutti i casi in cui è stata rilevata la positività delle uova, questa era dovuta alla positività del tuorlo, mentre i corrispondenti campioni di albume sono sempre risultati negativi. Per quanto sia possibile che il virus sia passato in entrambi i distretti ma nell'albume, più ricco di difese antimicrobiche naturali rispetto al tuorlo, in quantità più basse tanto da non risultare rilevabile in PCR, la negatività degli albumi osservata potrebbe indurre ad escludere una contaminazione attraverso il guscio e a considerare che molto più probabilmente si sia trattato di una vera e propria trasmissione verticale con un effettivo passaggio, nella femmina, del virus a livello del follicolo e quindi del tuorlo dell'uovo.

In ogni caso, tale modalità di trasmissione non sembrerebbe aver rivestito, nel gruppo, particolare rilievo dal punto di vista epidemiologico, in quanto si sarebbe verificata solo nel primo anno considerato, cioè durante l'esordio del focolaio. Nelle due stagioni successive, nonostante la positività in PCR a livello del follicolo delle penne dei riproduttori con la possibilità di eliminare il virus nell'ambiente attraverso penne e desquamazioni cutanee, il virus non è stato più rilevato nelle uova. Inoltre, anche nel corso della prima stagione, non tutte le coppie davano origine a uova infette, anche se la percentuale di uova positive, soprattutto nei nidi 1 e 2, risultava rilevante rispetto a quanto precedentemente riscontrato da altri Autori.

Un dato molto interessante che emerge dalla ricerca è quello molecolare che conferma l'effettiva corrispondenza del virus identificato nelle uova con quello dei riproduttori, in quanto sembrerebbe evidenziare un notevole adattamento di specie dello stipite *BFDV*, che oltre ad aver riprodotto nell'adulto le manifestazioni cliniche sovrapponibili a quelle generalmente osservate nel pappagallo in corso di Malattia del Becco e delle Penne, sembrerebbe aver avuto una buona capacità di diffusione nell'organismo con coinvolgimento dell'apparato riproduttore.

## CONCLUSIONI

I dati ottenuti sembrano evidenziare il verificarsi di trasmissione verticale di *circovirus* in corso di infezione, anche in caso di stipiti che infettano una specie che non rappresenta quella di elezione. Tuttavia, l'eliminazione del virus attraverso le uova, per quanto possa anche avvenire in percentuali non trascurabili, sembra limitata nel tempo e non sembra perdurare per più di una stagione riproduttiva.

## BIBLIOGRAFIA

- Allan G.M., Ellis J.A. (2000). Porcine circoviruses: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 3-14.
- Chen, C.L., Chang P.C., Lee M.S., Shein J.H., Ou S.J., Shieh H.K. (2003). Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Taiwan. *Avian Pathology*, 32, 165-171.
- Circella C., Caroli A., Pugliese N., Legretto M., Todisco G., Di Paola G. Camarda A. (2012). Infezione da Circovirus nei volatili d'affezione: approccio diagnostico clinico e molecolare. *Veterinaria*, Anno 26, n.6: 15-22.
- Circella E., Legretto M., Pugliese N., Caroli A., Bozzo G., Accogli G., Lavazza A., Camarda A. (2014). Psittacine beak and feather disease-like illness in Gouldian finches (*Chloebia gouldiae*). *Avian Diseases* 58(3): 482-487.
- Dayaram A., Goldstien S., Zawar-Reza P., Gomez C., Harding J.S., Varsani A. (2013). Identification of Starling Circovirus in an Estuarine Mollusc (*Amphibola crenata*) in New Zealand Using Metagenomic Approaches. *Genome Announcements*. Vol.1(3): e00278-13.
- De Caro N., Martella V., Desario C., Lanave G., Circella E., Cavalli A., Elia G., Camero M., Buonavoglia C. (2014). Genomic characterization of a Circovirus associated with fatal hemorrhagic enteritis in dog, Italy. *PloS ONE*, 9 (8), 1-5.
- de Kloet E., de Kloet S.R. (2004). Analysis of the beak and feather disease viral genome indicates the existence of several genotypes which have a complex psittacine host specificity. *Archives of Virology*. 149: 2393-2412.
- Duchatel, J. P., Todd D., Smyth J. A., Bustin J.C., Vindevogel. H. (2006). Observations on detection, excretion and transmission of pigeon circovirus in adult, young and embryonic pigeons. *Avian Pathology*, 35, 30-34.
- Eisenberg, S.W.F., van Asten A.J.A.M., van Ederen A.M., Dorrestein (2003). Detection of circovirus with a polymerase chain reaction in the ostrich (*Struthio camelus*) on farm in the Netherlands. *Veterinary Microbiology*, 95, 27-38.
- Ellis J.A., Krakowka S., Laimore M., Haines D., Bratanich A., Clark E., Allan G., Konoby C., Hassard L., Meehan B., Martin K., Harding J., Kennedy S., McNeilly F. (1999). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11, 3-14.
- Gerlach H. (1994). Circoviridae - Psittacine Beak and Feather Disease Virus. In: Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R. (Eds.) *Avian medicine: principles and application*. Wingers Publishing, Lake Worth pp. 894-902.
- Halami M.Y., Nieper H., Muller H., Johne R. (2008). Detection of novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) by using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*. 132(1-2):208-12.

- Li L., McGraw S., Zhu K., Leutenegger C.M., Marks S.L., Kubiski S., Gaffney P., Dela Cruz F.N.Jr, Wang C., Delwart E., Pesavento P.A. (2013). Circovirus in tissues of dogs with vasculitis and hemorrhage. *Emerg. Infect Dis.* 19(4), 534-541.
- Li Z., Wang X., Zhang R., Chen J., Xia L., Lin S., Xie Z., Jiang S. (2014). Evidence of possible vertical transmission of duck circovirus. *Veterinary Microbiology*,174: 229-232.
- Lian H., Liu Y., Li N., Wang Y., Zhang S., Hu R. (2014). Novel circovirus from mink, China. *Emerg. Infect Dis.* 20(9), 1548-1550.
- Niagro, F.D., Forsthoefel, A.N., Lawther, R.P., Kamalanathan, L., Ritchie, B.W., Latimer, K.S., Lukert, P.D. (1998). Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminiviruses and plant circoviruses. *Archives of Virology.* 143, 1723-1744.
- Phenix, K.V., Weston J.H., Ypelaar I., Lavazza A., Smyth J.A., Todd D., Wilcox G.E., Radial S.R. (2001). Nucleotide sequence analysis of a novel circovirus of canaries and its relationship to other members of the genus *Circovirus* of the family *Circoviridae*. *Journal of General Virology*, 82, 2805-2809.
- Rahaus M., Desloges N., Probst S., Loebbert B., Lantermann W., Wolff M.H. (2008). Detection of beak and feather disease virus DNA in embryonated eggs of psittacines birds. *Veterinari Medicina*, 53: 53-58.
- Rampin, T., G. Manarolla, G. Pisoni, C. Recordati, and G. Sironi. (2006). Circovirus inclusion bodies in intestinal muscle cells of a canary. *Avian Pathology*, 35, 277-279..
- Shivaprasad, H.L., P.W. Woolcock, A.E. Castro, R.P. Chin, R.W. Nordhausen, C.U. Meteyer, J.S. Jeffrey, B.C. Barr, and R. Droual. (1993). Identification of viruses from the intestine of ostriches. *Proceedings of the 36th Annual Meeting, American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. Las Vegas, NV, USA. p. 107.
- Shivaprasad H.L., Hill D., Todd D., Smyth J.A. (2004). Circovirus infection in a Gouldian gouldiae. *Avian Pathology*. 33: 525-529.
- Stewart M.E., Perry R., Raidal S.R. (2006). Identification of a novel circovirus in Australian ravens (*Corvus coronoides*) with feather disease. *Avian Pathology*. 35: 86-92.
- Todd D. (2000). Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathology*. 29: 373-394.
- Todd D., Bendinelli M., Biagini P., Hino S., Mankertz A., Mishiro S., Niel C., Okamoto H., Raidal S., Ritchie B.W., Teo G.C. (2005). *Circoviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., L.A. Ball (Eds) *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier/Academic Press, pp. 327-334.

- Todd D., Gortazar C. (2012). Circovirus infection. In: *Infection Diseases of Wild Mammals and Birds in Europe*. Edited by: Gavier-Widen D., Duff J.P., Meredith A. Wiley-Blackwell Publishing. Cap. 4: 67-72.
- Todd D., Weston J., Ball N.W., Borghmans B.J., Smyth J.A., Gelmini L., Lavazza A. (2001). Nucleotide sequence-based identification of a novel circovirus of canaries. *Avian Pathology*. 30: 321-325.
- Todd D., Weston J.H., Soike D., Smyth J.A. (2001 b). Genome sequence determination and analyses of novel circovirus from goose and pigeons. *Virology*, 286: 354-362.
- Todd, D. (2004). Avian circovirus diseases: lesson for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.* 98, 169-174.
- Todd, D., E. Fringuelli, A.N. Scott, B.J. Borghmans, J.P. Duchatel, H.L. Shivaprasad S.R. Raidal, J.X. Abadie, M.P. Franciosini, J.A. Smyth. (2008). Sequence comparison of pigeon circoviruses. *Research in Veterinary Science*, 84, 311- 319.
- Twentyman C.M., Alley M.R., Meers J., Cooke M.M., Duignan P.J. (1999). Circovirus-like infection in a southern black-backed gull (*Larus dominicanus*). *Avian Pathology*. 28: 513-516.
- Varsani A., Regnard G.L., Bragg R., Hitzeroth I.I., Rybicki E.P. (2011). Global genetic diversity and geographical and host-species distribution of beak and feather disease virus isolates. *Journal of General Virology*. 92:752-767.
- Yu X., Zhu C., Zheng X., He S., Liu X. (2007). Genome analysis and epidemiological investigation of goose circovirus detected in eastern China. *Virus Genes*. 35(3), 605-609.
- Zhang Z., Jia R., Lu Y., Wang M., Zhu D., Chen S., Yin Z., Chen X., Cheng A. (2013). Identification, genotyping, and molecular evolution analysis of duck circovirus. *Gene* 529(2), 288-295.