

CO-INFEZIONE DI AVIAN ORTHOREOVIRUS E CHICKEN ASTROVIRUS IN BROILER: DIAGNOSI IN REAL-TIME PCR E RILIEVI ISTOLOGICI

Stamilla A.¹, Messina A.³, Sallemi S.³, Lanza M.¹, Puleio R.², Loria G.R.², Cascone G.², Antoci F.²

¹ *Dipartimento Agricoltura, Alimentazione e Ambiente (Di3A), Università di Catania, Italia;*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italia;*

³ *Libero professionista.*

Abstract

The intensive production of chicken meat, commonly called broilers, is spread all over the world and consist of raise animal in sheds on a litter with a controlled climate and with a standard feed. The raising techniques, pushed to the limits to obtain the maximum production of meat, can favor the onset of diseases or in general the loss of income caused by illness. The variety of pathogens for the intensive poultry production chain are well known and generally controlled by modern management techniques. The study investigations, carried out in a poultry farm in eastern Sicily, reports a case of runting stunting syndrome (RSS), within a usual fattening cycle. After a macroscopic analysis some animals appear appears to have delayed development, they had difficulty of ambulation and were exhausted with signs of diarrhea. Once the necropsy was performed, intestinal lesions were detected in three of the five subjects. Then samples were collected for microbiological, parasitic and virologic research, which identified the co-infection with CAstV and ARV by Real-Time PCR, while the histological examination confirmed various degrees of damage to the intestinal mucosa from sub-acute to chronic; there were also lesions affecting the liver and kidneys. The detection of viruses was developed by Real-Time PCR, while the histological analysis was developed by embedding the tissue in paraffin wax, routinely processed stain with hematoxylin and eosin (HE).

RIASSUNTO

La produzione intensiva di carne di pollo (broiler), è diffusa in tutto il mondo e consiste nel far ingrassare l'animale in capannoni al chiuso, su una lettiera, con temperatura e fotoperiodo controllato, utilizzando mangimi standard. Le tecniche di allevamento spinte ad ottenere la massima produzione di carne, possono favorire l'insorgenza di malattie o in generale la perdita di reddito causata dal cattivo stato di salute degli animali. I patogeni a rischio per la filiera produttiva avicola intensiva sono ben noti e generalmente controllati dalle moderne tecniche di management. Lo studio riporta indagini eseguite in una azienda avicola della Sicilia Orientale a seguito del riscontro di mancato accrescimento nei soggetti in produzione. All'interno di un ciclo di ingrasso, sono stati identificati dei soggetti che manifestavano crescita ritardata, taglia e peso al di sotto delle performance di razza, inoltre alcuni presentavano difficoltà a deambulare e segni di diarrea. Effettuata la necropsia, sono state evidenziate lesioni intestinali in tre dei cinque soggetti, quindi sono stati eseguiti campionamenti per ricerca microbiologica, parassitaria, virologica tramite cui è stata identificata la co-infezione da CAstV e ARV mediante Real-Time PCR, mentre l'esame istologico ha confermato a vario grado lesioni alla mucosa intestinale da sub-acuto a cronico; sono presenti anche lesioni a carico del fegato e dei reni.

INTRODUZIONE

Il settore avicolo è il settore zootecnico più sviluppato e in rapida crescita, oltre ad essere il più flessibile tra tutti i tipi di allevamento, spinto da una domanda in costante crescita, si è espanso, consolidato e globalizzato in paesi con i più diversi livelli di reddito e tradizioni religiose. In Italia è realizzato sovente con tecniche di allevamento intensivo di tipo industriale, impiegando ceppi genetici ad elevata velocità di crescita, e regimi alimentari intensivi applicati in condizioni di allevamento strettamente controllato per quanto riguarda i parametri microclimatici (fotoperiodo, umidità, ecc.). In queste condizioni di produzione intensiva, spesso possono verificarsi criticità, quali le condizioni igieniche dei capannoni di ingrasso, indici di stress elevati legati al sovraffollamento, al fotoperiodo o alla temperatura controllata, dando origine a infezioni opportuniste. Le norme sanitarie vigenti mirano al benessere animale e a prevenire qualsiasi maltrattamento degli animali sia durante il ciclo produttivo, trasporto e macellazione. Tuttavia, queste regole non sempre vengono rispettate, spesso per far fronte alla sempre crescente domanda da parte dei consumatori che ha indotto il settore a crescere in modo esponenziale. Tale evidenza non sempre ha visto una contemporanea, adeguata gestione sanitaria degli allevamenti con il presentarsi di forme infettive ben note agli allevatori o ancora da patogeni emergenti, cause frequenti di cali produttivi o peggio, di elevata mortalità che portano a delle grosse perdite economiche. Gli agenti patogeni si diffondono molto facilmente nell'ambiente e può resistere nell'ambiente per molti giorni, anche dopo le operazioni di pulizia e disinfezione. I virus sebbene siano parassiti obbligati delle cellule dell'ospite e teoricamente eliminabili con la gestione sanitaria "tutto pieno, tutto vuoto", in molti casi sopravvivono per giorni anche dopo assenza di animali e disinfezione. Nella nostra indagine descriviamo un focolaio confermato in laboratorio di co-infezione da due virus enterici, spesso ubiquitari, delle specie avicole: l'*Avian Orthoreovirus* (ARV) e il *Chicken Astrovirus* (CAstV).

L'*Avian Orthoreovirus* (ARV) isolato per la prima volta da un pollo selvatico con artrite virale da 1954 (Fahey, 1953), è uno virus aviari più diffusi negli allevamenti avicoli, che causa perdite economiche per la produzione totale (Rosenberger, 1989), appartiene alla famiglia *Reoviridae* e ha il genoma segmentato di dsRNA (D.A. Spandidos, 1976). ARV causa l'artrite e la tenosinovite negli allevamenti di pollame (Heide, 1977), immunodepressione (Savage, 1987), malattie enteriche (Pomeroy, 1967) e sindrome di arresto della crescita (M.A. Goodwin, 1993). Molte specie avicole sono suscettibili, nei broiler causando artrite virale e tenosinovite (H.L. Van der, 1975), questa infezione è in genere caratterizzata da elevata morbilità e mortalità, scarsa conversione alimentare dei mangimi e ritardo della crescita (K.N. Dobson, 1992).

Turkey	TAstV-1 TurkeyAstrovirusType 1
<i>Avastrovirus 1</i>	TAstV-2 TurkeyAstrovirusType 2
Chicken	ANV AvianNephritis
<i>Avastrovirus 2</i>	CAstV Chicken Astrovirus
Duck	DAstV-1 DuckAstrovirusType 1
<i>Avastrovirus 3</i>	DAstV-2 DuckAstrovirusType 2

Tabella 1. Le tre specie di *Astrovirus* in base all'ospite

Il *Chicken Astrovirus* (CAstV) è l'ultimo virus, in ordine di tempo, identificato dalle specie avicole di interesse economico, appartiene alla famiglia *Astroviridae* e ha un genoma ssRNA, non incapsulato (E. Méndez, 2013). Generalmente, gli astrovirus, causano infezioni enteriche e infettano molte specie animali tra cui l'uomo (Smyth, 2017). Secondo il comitato internazionale di tassonomia è possibile distinguere tre specie, vale a dire gli avastrovirus 1, 2 e 3 (Smyth, 2017) (Tab 1), solo due di questi infettano i polli causando problemi di crescita, sviluppo ritardato enterite e lesione renale. *Avian Nephritis* (ANV) è stato isolato per la prima volta nel 1976 da un pulcino di una settimana (Yamaguchi S., 1979), *Chicken Astrovirus* (CAstV) è molto comune nel pollo da carne e ha forti associazioni con malattie di soggetti giovani, infatti, sviluppa una malattia da incubatoio che si verifica prima o durante la schiusa. CAstV è un patogeno enterico trasmesso orizzontalmente per via oro-fecale, o verticalmente da un genitore malato cronico e i pulcini, che al momento della schiusa, spargono un'alta quantità di virus nell'ambiente. CAstV è più resistente alla disinfezione e alla pulizia di altri virus, anche se privo di involucro, può resistere nei capannoni dove viene trasportato da coltteri che possono agire da vettore (Rosenberger J., 2010). La malattia coincide con l'insorgenza di cisti intestinali che riducono l'assorbimento dei nutrienti insieme a una ridotta dimensione dei villi o alla forma alterata degli stessi, altri sintomi comuni includono enterite e diarrea, debolezza delle gambe e piumaggio irregolare (Kouwenhoven B., 1978).



DESCRIZIONE DELL'EPIDEMIA

Durante l'ultimo giorno del un ciclo di ingrasso al fine di valutare il peso raggiunto e le performance di crescita, sono stati selezionati cinque animali, tre di questi presentavano uno sviluppo ritardato come se fossero di età inferiore, i soggetti presentavano inoltre segni clinici come difficoltà motorie, spossatezza, tracce di diarrea nella regione cloacale e gonfiore dei seni infraorbitari. Il peso corporeo di questi tre soggetti era sensibilmente inferiore degli altri due. A seguito della macellazione, sono stati prelevati campioni di organi per l'individuazione di eventuali patogeni intestinali. La razza in allevamento era l'ibrido commerciale Ross 308, soggetti maschi, di 42 giorni di età. L'autopsia ha evidenziato un insufficiente sviluppo della muscolatura del petto, lesioni emorragiche con aree necrotiche al fegato, segni di enterite emorragica in alcuni tratti intestinali.

ANALISI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

I linfonodi cecali dei tre diversi animali sono stati prelevati e sottoposti a screening molecolare per l'individuazione di CAstV e ARV attraverso la Real-Time PCR. Un campione di tampone tracheale è stato utilizzato per il rilevamento di *Avian Metapneumovirus* (aMPV). Per la purificazione è stato utilizzato il protocollo standard del kit commerciale "Kylt® RNA/DNA Purification" mentre per l'amplificazione è stato utilizzato il protocollo commerciale di "Kylt® Chicken Astrovirus", "Kylt® Avian Reovirus" e "Kylt® aMPV A&B"

ESAME ISTOLOGICO

Il fegato, la milza, i reni, gli arti, ed i tratti intestinale del duodeno, del digiuno e dell'ileo sono stati prelevati per lo studio delle lesioni evidenziate in sede autoptica e per indirizzare ulteriori indagini eziologiche. Le parti rappresentative di ciascun campione, sono state fissate in formalina tamponata al 10%, incorporate in paraffina e processate. Sezioni di spessore di 1.25 micron sono state ottenute e colorate con ematossilina ed eosina (EE) per l'esame istologico.

ESAME PARASSITOLOGICO E BATTERIOLOGICO

È stato effettuato un esame parassitologico su feci e contenuto intestinale, per la ricerca di Cestodi, Nematodi o Coccidi. Inoltre, sono state effettuate delle colture su piastra per escludere la possibile presenza di batteri patogeni come *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*.

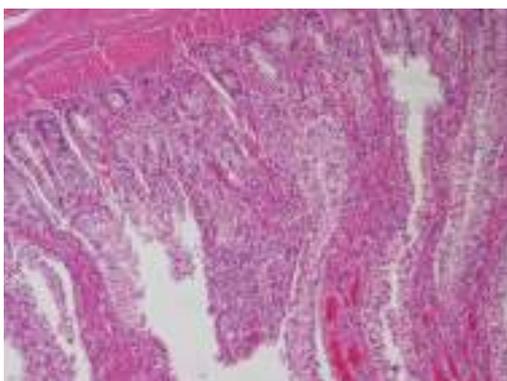
RISULTATI

Animale	BW (kg)	aMPV	CAstV	ARV
1	3.439	X	X	X
2	1.243	X	V	V
3	1.350	X	V	V
4	1.268	X	V	V
5	3.502	X	X	X

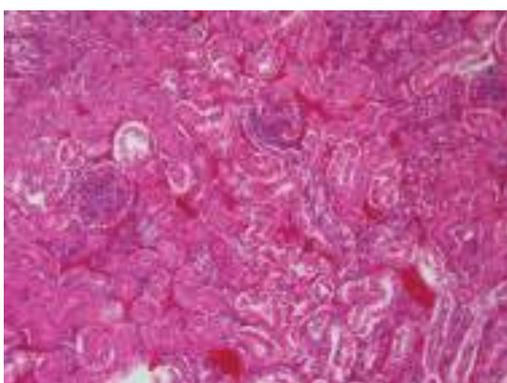
Negli animali numero 2, 3 e 4 sono state osservate enterite emorragica, necrosi epatica e gonfiore dei seni infraorbitari. Durante la necropsia, risultava evidente la dimensione anormale del rene e del fegato dell'animale numero 4, il doppio in dimensione, rispetto agli organi degli altri due animali. Le indagini microbiologiche non hanno evidenziato la presenza di parassiti e/o batteri patogeni. L'analisi molecolare ha confermato il sospetto di una infezione mista di origine virale: i soggetti n. 2, 3 e 4 erano positivi per ARV e CAstV mentre tutti e cinque gli animali sono risultati negativi al aMPV A&B (Tab. 2). Dall'esame istologico è emerso uno stato infiammatorio a carico del fegato con aree focali di infiltrato monocitario e aree di degenerazione; nel rene sono presenti infiltrati multifocali linfo-granulocitari nell'interstizio e necrosi tubulare, mentre nella mucosa intestinale si riscontrano diffusi infiltrati linfocitari con fusione dei villi.

DISCUSSIONE

Lo studio ha evidenziato lo stato di infiammazione a seguito della co-infezione dei virus CAstV e ARV, tutti e due implicati nella sindrome del mancato assorbimento. La presenza di infiltrato sia a livello del fegato che dei reni ha evidenziato che i due virus, a tropismo prevalentemente enterico, possano localizzarsi e creare scompensi anche in altri organi; nel rene determinando una riduzione della funzione filtrante dei glomeruli; nel fegato, causando una degenerazione diffusa nel fegato con un conseguente malfunzionamento dello stesso. Nell'intestino si riscontra il quadro peggiore, dove i villi non posseggono più una struttura organizzata, ma risultano fusi con un diffuso infiltrato linfocitario susseguente all'infezione. Il sospetto iniziale di una infezione virale è stato confermato dall'esame biomolecolare, mentre le analisi batteriologiche e parassitologiche hanno dato esito negativo. L'enterite diffusa riscontrata all'esame anatomico-patologico è stata confermata anche all'esame istologico, con cui sono stati evidenziati anche quadri istolesivi a carico del fegato e del rene. Questo studio preliminare ha offerto molti spunti per analizzare lo stato di infezione negli animali allevati e le possibili fonti di contaminazione e trasmissione dei due virus. Particolare attenzione verrà data al CAstV e ai possibili altri virus che possono essere presenti in co-infezione.



EE 20x, enterite monocitaria



EE 20x, nefrite interstiziale

BIBLIOGRAFIA

1. Bulbule N.R., M. K. (2013). Role of chicken astrovirus as a causative agent of gout in commercial broilers in India. *Avian Pathol.*, 464–473.
2. D.A. Spandidos, a. F. (1976). Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.*, 19, 968-976.
3. E. Méndez, A. M. (2013). Replication cycle of astroviruses. *S. Schultz-Cherry (Ed.), Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions, Springer New York, New York*, 19-45.
4. Fahey, J. C. (1953). Studies on chronic respiratory disease Of chickens II. Isolation of A virus.
5. H.L. Van der, M. K. (1975). Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolant as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.*, 19, 683-688.
6. Heide, V. D. (1977). *Viral arthritis/tenosynovitis: a review*. *Avian Pathol.*, 6 (1977), pp. 271-284.