

## **ENCEFALOMIELITE AVIARE (AE) NEL POLLO DA CARNE E NELLA POLLASTRA OSSERVATI NELL'ANNO 2010**

Fiorentini L., Tosi G., Taddei R., Gibelli L., Gelmetti D., Massi P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini" - Brescia*

### **Summary**

Avian encephalomyelitis (AE) is an infectious viral disease affecting young chickens, pheasants, quail and turkeys. It is characterized by ataxia and rapid tremors, especially of the head and neck "epidemic tremor", drop in egg production and hatching rate in laying hens.

Two cases of avian encephalomyelitis observed in 2010 in the pullet and broiler was described. Severe nervous symptoms were observed at 20 days of age in broilers and between 70-100 days of age in pullets. In both cases, the diagnosis was Avian Encephalomyelitis.

### **Riassunto**

L'Encefalomielite Aviare è una malattia virale che colpisce i polli, i fagiani, le quaglie ed i tacchini. E' caratterizzata da atassia, tremori localizzati soprattutto nella regione della testa e del collo "tremore epidemico", calo dell'ovodeposizione e riduzione del tasso di schiusa nell'ovaiola. Si descrivono due casi di Encefalomielite Aviare osservati nel 2010 nel broiler e nella pollastra. Venivano osservati gravi sintomi nervosi a 20 giorni nei broilers e tra 70 ed i 100 giorni di vita nelle pollastre. In entrambi i casi la diagnosi è stata di Encefalomielite Aviare.

### **INTRODUZIONE**

L'Encefalomielite Aviare (AE) è una malattia virale che colpisce i polli, i fagiani, le quaglie ed i tacchini. E' caratterizzata da atassia, tremori localizzati soprattutto nella regione della testa e del collo "tremore epidemico", calo dell'ovodeposizione e riduzione del tasso di schiusa nell'ovaiola. La malattia è stata segnalata per la prima volta negli anni '30 negli Stati Uniti in pulcini *Rhode Island Red* di due settimane di vita. Segnalata per la prima volta in Europa quindi in Italia nel 1961. L'agente causale dell'AE è un enterovirus appartenente alla famiglia *Picornaviridae*. Non sono state dimostrate differenze sierologiche tra i vari stipiti isolati, mentre si distinguono due patotipi: enterotropo e neurotropo. I ceppi isolati da casi di infezione naturale sono in prevalenza enterotropi ed infettano i pulcini per via oro fecale. Il neurotropismo varia da ceppo a ceppo. Il virus dell'EA replica in uova embrionate di pollo inoculate per via intravitellina ed in colture di cellule neurogliali embrionali, renali e pancreatiche e su fibroblasti di embrioni di pollo.

Il ceppo enterotropo può trasmettersi per via verticale od orizzontale, assume carattere neurotropo nei pulcini, risulta scarsamente patogeno nei soggetti adulti nei quali determina caduta dell'ovodeposizione. Il ceppo neurotropo causa una grave sintomatologia nervosa nel pulcino inoculato per via sperimentale, non risulta patogeno se assunto per via orale in quanto incapace di moltiplicarsi a livello intestinale. Il virus può infettare le uova deposte per circa un mese dalla fase acuta

d'infezione nella gallina. In questo caso si osserva una riduzione del tasso di schiusa e la nascita di pulcini con sintomi nervosi: depressione, tremori della testa e del collo, atassia progressiva fino alla paralisi, a partire già dal primo giorno di vita. La diffusione del virus avviene per via oro-fecale con massima escrezione tra le 2 e le 3 settimane nel corso delle quali anche la sintomatologia raggiunge la sua massima espressione. I sintomi sono tanto più gravi tanto più precoce è l'infezione, per questo l'esposizione al virus dopo la terza settimana di vita non sempre determina la comparsa di sintomatologia apprezzabile. Le galline in deposizione raramente mostrano segni clinici. La mortalità può raggiungere mediamente il 25% fino al 60%, la morbilità è legata allo stato immunitario dei riproduttori. La diagnosi clinica nei soggetti giovani è molto importante e va differenziata da altre malattie come Malattia di Marek, encefaliti purulente, encefaliti micotiche, carenze vitaminiche, stati tossici.

Non sono state descritte lesioni anatomopatologiche patognomoniche, la diagnosi virologica ed istologica sono di fondamentale supporto (1; 2).

Questo lavoro descrive alcuni focolai di EA in tre allevamenti di polli da carne ed in due allevamenti di pollastre, osservati nel corso dell'anno 2010, presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER.

## **MATERIALI E METODI**

### *Dati anamnestici e prelievo dei campioni*

#### *Pollo da carne*

A maggio 2010, in tre allevamenti di polli da carne ciascuno costituito da circa 40.000 capi, nati tutti dallo stesso gruppo di riproduttori, venivano osservati sintomi neurologici caratterizzati da blandi tremori del capo ed atassia locomotoria nei pulcini a partire dalla prima settimana di vita. Veniva stimata una mortalità del 4%. Le autopsie effettuate in allevamento, mostravano lesioni da colisetticemia, per questo motivo il gruppo veniva trattato con enrofloxacin, amoxicillina e polivitaminici. Il tasso di mortalità imputato alla colisetticemia era decisamente alto e tendeva a crescere fino al 10% a 15gg. Venivano quindi conferiti circa 20 soggetti, di 15 giorni di vita, in parte vivi ed altri morti, presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'IZSLER. Dopo l'osservazione clinica, tutti gli animali venivano sottoposti ad esame autoptico, venivano prelevati: cervello per esame batteriologico, micologico, RT PCR EA; venivano allestiti campioni di encefalo, cuore, ed una sezione di muscolo scheletrico per l'esame istologico.

#### *Pollastra*

A metà ottobre 2010, in due allevamenti di pollastre leggere Hyline, entrambi con una consistenza di circa 50.000 capi, venivano osservati sintomi neurologici a partire dai 50 giorni di vita con picco a 70 giorni, persistenza fino ai 95/100 giorni poi, a seguire, una graduale remissione. Conseguiva un notevole calo del consumo di mangime e ridotto accrescimento corporeo. Veniva stimata una morbilità del 1,5% a circa 70 giorni. Difficile stimare correttamente i dati relativi alla mortalità nella fase acuta del problema, questo perchè i soggetti clinici venivano giornalmente individuati e soppressi. Solo l'ultima selezione degli animali al carico, che evidenziava molti soggetti apparentemente ciechi, permetteva di stimare una perdita totale del 6,5%. Venivano conferiti 6 soggetti vivi per allevamento di circa 50 giorni di vita. Dopo l'osservazione clinica, tutti gli animali venivano sottoposti ad esame autoptico,

venivano prelevati: cervello per RT PCR EA. Campioni di encefalo, fegato, milza, stomaco ghiandolare, nervi ischiatici di ciascun gruppo erano fissati in formalina al 10% per la valutazione istologica.

#### *RT-PCR per la ricerca dell'AEV*

L'estrazione dell'RNA da omogenato di cervello veniva condotta mediante l'utilizzo del kit commerciale RNeasy Mini Kit (Qiagen®), secondo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice. Veniva allestita una reazione di RT-PCR che amplifica un frammento di 619bp del gene VP2 del virus dell'Encefalomyelite aviaria (Xie et al., 2005) utilizzando il kit OneStep RT-PCR (Qiagen®). In particolare, in 25µl totali venivano miscelate le seguenti componenti: 1µM di ogni primer (MK AE 1: 5'-CTTATGCTGGCCCTGATCGT -3', MK AE 2: 5'-TCCCAAATCCACAAACCTAGCC -3'), 5µl di 5X Onestep RT-PCR Buffer, 0.4nM di ogni dNTP, 12.5U di inibitori delle Rnasi, 1µl di OneStep RT-PCR enzyme mix e 5µl di estratto di RNA. Profilo di amplificazione: 1 X (50°C, 30 min), 1 X (94°C, 15 min), 35 X (94°C, 1 min; 62°C, 1 min, 72°C, 1 min), 1 X (72°C, 10 min).

#### *Isolamento dell'AEV*

Veniva allestito un inoculo su uova embrionate di pollo SPF di 6 giorni d'incubazione mediante iniezione intravitellina a partire da omogenati di cervello. Non venivano eseguiti passaggi ciechi col tentativo di portare i pulcini alla schiusa.

#### *Esame istologico*

I campioni sono stati disidratati ed inclusi in paraffina secondo le metodiche in uso, sezioni seriate di 5micron sono state colorate con ematossilina-eosina.

## **RISULTATI**

### *Pollo da carne*

#### Sintomi clinici

Veniva fatta un'osservazione clinica negli animali vivi che permetteva di confermare la presenza di sintomi nervosi, gli animali mostravano ottundimento del sensorio, tremore del capo, nei casi più gravi decubito laterale con incapacità di movimento ed insensibilità agli stimoli esterni.

#### Esame anatomopatologico

Il gruppo si presentava gravemente disomogeneo, con disparità di sviluppo scheletrico e muscolare, apparato gastroenterico vuoto, in alcuni soggetti si osservava edema sottocutaneo, non si osservavano altre lesioni di rilievo nei restanti apparati.

#### Esame batteriologico e micologico

Non veniva dimostrata crescita batterica nè fungina nei campioni di cervello.

#### RT PCR per la ricerca dell'AEV

L'omogenato di pool di cervelli prelevati in sala autoptica dimostrava la presenza dell' EAV. Anche il cervello prelevato dai pochi embrioni morti prima della schiusa, così come quello prelevato dai soggetti nati dalle uova embrionate, inoculate col campione patologico, dimostravano la presenza dell'AEV con RT PCR.

#### Isolamento dell'AEV

Non veniva registrata mortalità embrionale significativa, le uova venivano portate alla schiusa al fine di dimostrare la riproduzione sperimentale dell'AE nei soggetti nati. I pulcini schiusi dalle uova inoculate mostravano gravi sintomi nervosi a partire dal quarto-quinto giorno di vita.

### Esame istologico

Le lesioni microscopiche in tutti gli animali erano localizzate prevalentemente nell'encefalo. Le prime osservazioni, evidenziavano un encefalite sub acuta, localizzata nelle aree basali e nello strato molecolare del cervelletto. L'infiltrato costituito prevalentemente da linfociti e plasmacellule aveva una disposizione perivasale. Peculiare era l'infiltrazione gliale che circondava le cellule del Purkinije e si estendeva allo strato molecolare del cervelletto con una caratteristica disposizione "a fiamma". Il quadro osservato era suggestivo di encefalite virale. Negli altri organi non si osservavano reperti di rilievo se non blandi segni di flogosi infiammatoria aspecifica.

### *Pollastra*

#### Sintoni clinici

Veniva fatta un'osservazione clinica negli animali vivi che permetteva di confermare la presenza di sintomi nervosi, gli animali mostravano grave depressione del sensorio, incoordinazione motoria, appoggio sui tarsi ed incapacità di mantenere la stazione, in alcuni casi, decubito laterale con iperestesia degli arti e delle falangi.

#### Esame anatomopatologico

Negli animali di entrambi gli allevamenti si osservava disparità di sviluppo e forte dimagrimento, apparato gastroenterico vuoto o con scarsa presenza di alimento, assenti altre lesioni visibili macroscopicamente.

#### RT PCR per la ricerca dell'AEV

#### Isolamento dell'AEV

Vedi quanto descritto nel caso precedente.

#### Esame istologico

Anche in questo caso le lesioni microscopiche in tutti gli animali erano localizzate prevalentemente nell'encefalo con lesioni sovrapponibili a quanto descritto per il pollo da carne. Si osservava inoltre una nevrite linfocitaria caratterizzata da manicotti e degenerazione Walleriana delle neurofibrille.

Il quadro osservato era suggestivo di encefalite virale. Negli altri organi non si osservavano reperti di rilievo se non blandi segni di flogosi infiammatoria aspecifica.

## **CONCLUSIONI**

Viene descritto in maniera sintetica quanto svolto al fine di giungere ad una diagnosi eziologica. Gli allevamenti di polli da carne studiati erano tre, accumulati dal gruppo di riproduzione e dal periodo di insorgenza dei sintomi. Non esistevano sostanziali differenze. In tutti si osservava una mortalità del 4% alla prima settimana di vita, con passaggio al 10% a 15 giorni, fino ad un picco del 15% a 20 giorni. I sintomi calavano gradualmente fino al carico delle femmine leggere (35gg). I pesi medi di macellazione delle femmine leggere, femmine medie (48gg) e maschi pesanti (52gg) risultavano nella norma. La spiegazione deriva dal fatto che quotidianamente, nell'allevamento, veniva effettuata una selezione degli animali con eliminazione anche di quelli sintomatici. I pulcini derivavano da riproduttori regolarmente vaccinati con vaccino vivo attenuato AE somministrato in acqua di bevanda, in unico intervento, a 10 settimane di vita.

Non è da escludere che in un momento commerciale in cui vi era una forte richiesta

del “prodotto pulcino”, venivano incubate uova “sottopeso” cioè di riproduttori molto giovani, anticipando la schiusa di almeno tre settimane e conseguente nascita di pulcini con scarsa immunità materna.

Anche nel caso degli allevamenti di pollastre, le indagini di laboratorio conducevano alla diagnosi di Encefalomyelite aviaria in entrambi gli allevamenti indagati. Non si avevano informazioni anamnestiche sul gruppo dei riproduttori e dal momento che la malattia si manifestava nel gruppo piuttosto tardivamente, si può supporre un’infezione orizzontale in soggetti con scarsa immunità materna, quindi scarso booster anticorpale protettivo o con ridotta capacità immunitaria di tipo attivo. Le pollastre venivano vendute sottopeso ad un unico allevamento di galline ovaiole, veniva segnalato un ritardo di entrata in deposizione del gruppo il quale, una volta raggiunto il peso fisiologico, manteneva una regolare curva di deposizione per tutto il ciclo produttivo.

Da diversi anni non si osservava questa patologia, la peculiarità di tutti i casi osservati sta nella comparsa di sintomi tardivi, bassa mortalità e morbilità rispetto a quanto normalmente viene descritto per questa patologia. L’approccio diagnostico in tutti i casi era simile, variava nei dati anamnestici e nella diagnosi differenziale, nessuna sostanziale differenza nella parte relativa alla ricerca del virus, all’isolamento ed alla diagnosi istologica.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Calnek B. (2008) Avian Encephalomyelitis in Saif Y.M., Barnes H.J., Glissen J.R., Fadly A M., McDougall L.R. and Swaine D.E. Disease of poultry, XII ed Iowa State University Press
2. Tannock G.A. and Shafren D.R. (1994) Avian Encephalomyelitis: a review. Avian Pathology 23: 603-620.
3. Xie Z. et al. (2005) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction to Detect Avian Encephalomyelitis Virus. Avian Diseases 49: 227-230.