

ISOLAMENTO DI AVIAN NEPHRITIS VIRUS (ANV) SU UOVA EMBRIONATE DI POLLO SPF: RISULTATI PRELIMINARI

Parigi M., Fregnani G., Caminiti A., Fiorentini L., Massi P., Tosi G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì.

Summary

Avian Nephritis Virus (ANV) is an astrovirus considered cause of diarrhea, interstitial nephritis, uricosis and dead in different avian species. In this study we reported the preliminary results of isolation, propagation and pathological characteristics of ANV in specific pathogen free (SPF) chicken embryonated eggs (CEE) from chickens and guinea-fowls with enteric and renal lesions. The CEE were inoculated via the yolk sack route at 14 days of incubation and the viral isolation was confirmed using PCR techniques. The embryos were small and presented several abnormalities in the internal organs, as livers enlarged and yellow, enlarged intestines filled with water and prominent ureter and urate deposition in the kidney. The viral replication was confirmed by RT-PCR in all the second-passage inocula.

INTRODUZIONE

Il virus della Nefrite Infettiva Aviaria (Avian Nephritis Virus, ANV), solo recentemente classificato come astrovirus (1), viene considerato causa di diarrea, nefrite interstiziale, tubulonefrosi, uricosi (gota) e morte nella specie avicole (2); gli animali giovani sono considerati più suscettibili (3), ma ne è stata rilevata la presenza anche in broilers che manifestavano scarso accrescimento ponderale e problemi renali (4). Tale virus, in associazione completa o parziale con altri virus enterici, quali Chicken Astrovirus (CAstV), Reovirus, Rotavirus e Chicken Parvovirus, viene ritenuto responsabile di condizioni cliniche quali, ritardo della crescita, depressione, ridotta conversione alimentare e bassa mortalità, altresì chiamate “runting-stunting syndromes”. In questo lavoro, riportiamo l'isolamento di Avian Nephritis Virus, e le lesioni macroscopiche riferibili alla sua replicazione, su uova embrionate di pollo SPF a partire da campioni di rene e contenuto intestinale di due diverse specie avicole.

MATERIALI E METODI

Scelta e preparazione degli inoculi

Gli inoculi utilizzati in questo studio sono stati scelti tra i campioni conferiti al laboratorio di Virologia della sede di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia-Romagna nel periodo marzo-maggio 2016 al fine di essere testati per la presenza di virus enterici (Reovirus, Rotavirus, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus) mediante RT-PCR. I quattro campioni selezionati erano risultati positivi unicamente per la presenza di Avian Nephritis Virus (ANV) e, di questi, 2 erano stati prelevati da polli e 2 da faraone. Fatta eccezione per una delle due faraone che all'esame anatomopatologico presentava solo segni di nefrite, gli altri 3 animali mostravano enterite di gravità variabile (Tabella 1). I campioni di rene e di intestino (contenuto e parete) sono stati preparati mediante sospensione di circa 1 g di organi (finemente sminuzzati) in 9 ml di PBS sterile (pH 7.4) e centrifugati a 3000

rpm per 7 minuti. Prima di procedere con l'inoculo delle uova, ciascuna sospensione virale è stata prima addizionata con una soluzione di antibiotici costituita da gentamicina, streptomina ed amfotericina B e, infine, filtrata utilizzando filtri a porosità decrescente da 1.2 μm - 0.45 μm - 0.2 μm .

Inoculazione di uova embrionate di pollo SPF

Fino al loro utilizzo, le uova embrionate di pollo Specific Pathogen Free (SPF; Charles River Laboratories International, Inc.) da utilizzare nello studio sono state mantenute, in incubatrice semiautomatica, alla temperatura di 37.5 gradi e ad un tasso di umidità del 50%. Per ogni inoculo sono state utilizzate uova a 14 giorni di incubazione, età in cui è già avvenuto il completo sviluppo anatomico e funzionale del tratto intestinale. L'unica via di inoculazione presa in considerazione è stata quella intravitellina. Ogni uovo è stato, quindi, disinfettato esternamente mediante tintura di iodio al 10% e punzonato nel punto scelto in fase di speratura. Per ogni campione, 5 uova sono state inoculate con 0.2ml di sospensione virale, mentre 1 uovo è stato utilizzato come controllo negativo e inoculato con 0.2 ml di PBS sterile. La vitalità embrionale è stata controllata giornalmente per 5 giorni post-inoculazione (p.i), al termine dei quali le uova rimaste vive sono state soppresse mediante refrigerazione. La morte nelle prime 24 ore dall'inoculazione è stata considerata aspecifica, mentre le uova morte a partire dal 2° giorno di incubazione e le uova soppresse al termine dei 5 giorni p.i sono state esaminate ai fini di evidenziare lesioni anatomopatologiche. Dagli embrioni di ciascun inoculo sono stati prelevati, in pool, fegato, milza, stomaco ghiandolare e muscolare, pacchetto intestinale e reni; tale omogenato di organi è stato risospeso in PBS sterile, centrifugato a 3000 rpm per 7 minuti ed utilizzato per eseguire un secondo passaggio secondo le modalità descritte sopra. Anche dagli embrioni del secondo passaggio sono stati prelevati, in pool, i medesimi organi e gli omogenati sono stati preparati come descritto in precedenza.

Valutazione delle lesioni e conferma dell'isolamento virale

Un accurato esame necroscopico è stato eseguito su ogni uovo inoculato. Gli embrioni sono stati analizzati sia per la presenza di alterazioni esterne quali, nanismo, arresto della crescita (stunting), aspetto gelatinoso ed edematoso, presenza di deformità, emorragie, sia per la presenza di alterazioni a livello di organi interni, in particolare fegato, stomaci, milza, reni ed intestino. Per ogni inoculo, la conferma dell'avvenuto isolamento virale è stata eseguita mediante RT-PCR multiplex (5) sui campioni ottenuti alla fine di ogni passaggio. Gli embrioni che presentavano lesioni macroscopiche e che sono risultati positivi allo screening molecolare sono stati considerati positivi.

Multiplex RT-PCR

Per ogni inoculo, i campioni ottenuti alla fine di ogni passaggio sono stati sottoposti ad estrazione del DNA ed RNA mediante estrattore semiautomatico KingFisher Flex (ThermoScientific) e gli estratti ottenuti sono stati testati mediante una multiplex RT-PCR (5) in grado di differenziare ed identificare contemporaneamente la presenza di Reovirus, Rotavirus, Chicken Astrovirus e Avian Nephritis Virus.

RISULTATI

Lesioni macroscopiche

L'inoculo 41 è stato l'unico in cui non è stata evidenziata mortalità in nessuno dei due passaggi, mentre nei rimanenti inoculi, la mortalità è stata sporadica e diluita nei

5 giorni p.i. Nel primo passaggio, gli inoculi 41 e 46 non hanno mostrato lesioni riferibili a replicazione virale, mentre nei rimanenti 2 sono state riscontrate sia lesioni esterne sia alterazioni a carico degli organi interni, quali dimensioni ridotte dell'embrione con colorazione verdastra del sacco vitellino, fegati aumentati di volume, friabili e giallastri, ventricoli e proventricoli edematosi ed aumentati di volume, dilatazione delle anse intestinali, in particolare del duodeno e dell'ampolla rettale, reni aumentati di volume con dilatazione degli ureteri e depositi di urati (gotta). Due inoculi presentavano anche splenomegalia. Tali lesioni sono state riscontrate anche negli embrioni dei secondi passaggi di tutti gli inoculi, ma di minore intensità a livello renale ed accentuate a livello dell'intestino. L'ampolla rettale in alcuni soggetti, infatti, si presentava fortemente dilatata, quasi palloni-forme con un contenuto anche schiumoso e di colore verde. Le lesioni si presentavano sia negli embrioni morti spontaneamente sia in quelli soppressi.

Conferma dell'isolamento virale mediante RT-PCR

I risultati dell'isolamento virale sono stati riassunti nella Tabella 1.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio sono stati riportati i risultati preliminari dell'isolamento di Avian Nephritis Virus su uova SPF a partire da campioni prelevati da diverse specie avicole (pollo e faraona) che presentavano, rispettivamente, disturbi enterici e renali. Considerando che l'età embrionale rappresenta un fattore determinante nella buona riuscita di un isolamento virale, l'inoculazione è stata eseguita su uova a 14 giorni di incubazione a livello di sacco vitellino. Infatti a tale età, l'apparato gastroenterico degli embrioni risulta essere non solo completamente formato, ma anche totalmente funzionante (6). Nonostante in uno studio precedente (4) sia stata utilizzata l'inoculazione intrallantoidea per l'isolamento del Chicken Astrovirus, in questo studio, in relazione alla natura anche enterotropica del virus e alla funzione nutritiva del sacco vitellino, è stato deciso di testare unicamente la via di inoculazione intravitellina con l'obiettivo di facilitare la replicazione virale e di ottenere lesioni anatomopatologiche significative. A conferma di questa ipotesi, negli embrioni sono state rilevate lesioni non solo compatibili con l'avvenuta replicazione di un virus enterotropo, ma, in alcuni casi, lesioni simili a quelle descritte in sede necroscopica in animali che manifestavano riduzione della crescita associata a sindromi enteriche (runting stunting syndrome), come ad esempio presenza di bolle a livello duodenale e dilatazione dell'ampolla rettale. Al contrario, Nunez e collaboratori (2015) (7), nel loro studio sull'isolamento di Chicken Astrovirus su uova SPF, non avevano osservato lesioni macroscopiche in nessuno degli embrioni infettati a 14 giorni, nonostante la positività evidenziata in multiplex RT-PCR fin dal primo passaggio. Nel nostro lavoro, invece, nonostante le lesioni macroscopiche fossero evidenti già nel primo passaggio, solo in un inoculo l'isolamento del virus è stato confermato in RT-PCR già nel primo passaggio e per gli altri 3 campioni la conferma di avvenuta replicazione virale è avvenuta solo alla fine secondo passaggio.

Per una migliore e più approfondita conoscenza del comportamento del virus, è necessario procedere con ulteriori tentativi di isolamento del virus testando, non solo diversi giorni di inoculazione, ma anche altre vie di inoculazione, ad esempio quella intrallantoidea.

N° INOCULO	ORIGINE DEL CAMPIONE	LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE DEGLI ANIMALI DA CUI SONO STATI PREPARATI GLI INOCULI DI PARTENZA	ISOLAMENTO ANV	
			1° PASSAGGIO	2° PASSAGGIO
41/16	faraona	Nefrite	Neg	Pos
43/16	faraona	Enterite catarrale e bolle nei ciechi	Neg	Pos
44/16	pulcino	Tiflite con contenuto schiumoso	Pos	Pos
46/16	pulcino	Lieve enterite	Neg	Pos

Tabella 1: Storia clinica degli animali da cui sono stati preparati gli inoculi di partenza e risultati degli isolamenti

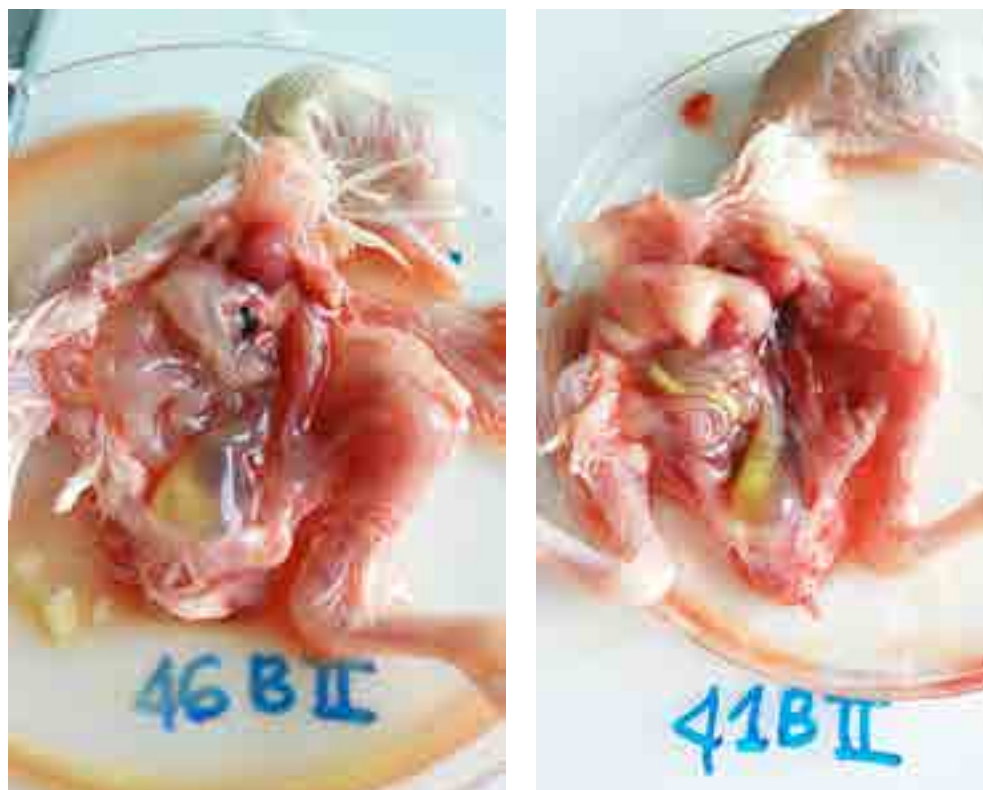


Fig. 1-2. A sx aumento di volume ed edema del ventriglio con dilatazione dell'ampolla rettale; a dx forte dilatazione delle anse intestinali e dell'ampolla rettale.



Fig. 3. Aumento di volume dei reni con dilatazione degli ureteri e deposito urati

BIBLIOGRAFIA

1. Imada T, Yamaguchi S, Mase M, Tsukamoto K, Kubo M, Morooka A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *Journal of virology*. 2000;74(18):8487-93.
2. Shirai J, Tanimura N, Uramoto K, Narita M, Nakamura K, Kawamura H. Pathologically and serologically different avian nephritis virus isolates implicated in etiology of baby chick nephropathy. *Avian diseases*. 1992;36(2):369-77.
3. Imada T, Taniguchi T, Yamaguchi S, Minetoma T, Maeda M, Kawamura H. Susceptibility of chickens to avian nephritis virus at various inoculation routes and ages. *Avian diseases*. 1981;25(2):294-302.
4. Bulbule NR, Mandakhalikar KD, Kapgate SS, Deshmukh VV, Schat KA, Chawak MM. Role of chicken astrovirus as a causative agent of gout in commercial broilers in India. *Avian pathology : journal of the WVPA*. 2013;42(5):464-73.
5. Day JM, Spackman E, Pantin-Jackwood M. A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavirus. *Avian diseases*. 2007;51(3):681-4.
6. Karcher DM, Applegate T. Survey of enterocyte morphology and tight junction formation in the small intestine of avian embryos. *Poultry science*. 2008;87(2):339-50.
7. Nunez LF, Parra SH, Mettifogo E, Catroxo MH, Astolfi-Ferreira CS, Piantino Ferreira AJ. Isolation of chicken astrovirus from specific pathogen-free chicken embryonated eggs. *Poultry science*. 2015;94(5):947-54.