

RUOLO DELL'INCUBATOIO NELL'EPIDEMIOLOGIA DELLA RUNTING-STUNTING SYNDROME (RSS) E CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI AVIAN NEPHRITIS VIRUS (ANV)

Grego E.¹, Bertolotti L.¹, Stella M.C.¹, Catania A.M.¹, Castellina C.²

¹*Università degli studi di Torino, Dipartimento Scienze Veterinaria, Via largo Paolo Braccini 2, 10094 Grugliasco (TO), Italia*

²*Aglietto natura s.r.l.*

Summary

Astrovirus is an emerging problem in hatchery management and is responsible of great economic losses in poultry farm worldwide. CAstV/ANV are involved in the hatching decrease caused by embryo deaths, chicks too weak to hatch and pale, runted chicks. Hatchery diseases are thought to occur with a direct egg infection or vertical transmission. Indeed what is the role of hatchery in the disease transmission? A high quality Piedmont (Italy) hatchery was submitted to an environmental and eggs/animals sampling to evaluate the presence of astrovirus. No positivity results was obtained from the hatchery environmental samples and external egg surface. Instead yolk sack at 18th day incubation, gut contents of 1 day chicks and the maps used for chicks transport resulted positive to ANV real time PCR. Furthermore, CastV was present at high copy number in samples collected from hatchery while ANV was more abundant in farms. This study confirm the vertical transmission for both virus with prevalence of amplification of CastV in tissues from hatchery and ANV in tissue from farm. Moreover the first Italy ANV complete genome was obtained from the gut contest of 1 to 7 day chick.

INTRODUZIONE

La sindrome da malassorbimento o Runting-Stunting Syndrome (RSS) è una patologia che provoca gravi perdite economiche nel settore dell'avicoltura globale, legate alla scarsa conversione alimentare, alla minore uniformità del gruppo e conseguente scarto dei polli affetti al momento della macellazione. Si tratta di una patologia emergente che negli ultimi vent'anni ha acquisito crescente interesse (Smyth et al., 2009).

Si tratta di una sindrome multifattoriale principalmente a eziologia virale multipla che colpisce il pollo da carne nelle prime due settimane di vita, determinando ritardo di accrescimento, feci diarroiche, problemi scheletrici e anomalie del piumaggio (Smyth, 2008).

Un ruolo importante nella RSS è svolto dall'Avian Nephritis Virus (ANV) e dal Chicken Astrovirus (CAstV), membri della famiglia Astroviridae e in particolare del genere Avastrovirus 2. Sono state infatti riscontrate cariche virali più elevate in campioni di animali affetti rispetto a campioni di soggetti sani. È stato inoltre dimostrato essere responsabili dei problemi di crescita, di enterite e lesioni renali nei pulcini (Devaney et al., 2016).

Recentemente, gli astrovirus degli avicoli sono stati anche associati a problematiche riscontrate in incubatoio, con riduzione della schiudibilità, morte embrionale tardiva e nascita di pulcini deboli (Smyth et al., 2013; Sajewicz-Krukowsk et al., 2016). Tuttavia, non esistono al momento studi che valutino il ruolo dell'incubatoio nella diffusione di questi virus.

Gli astrovirus degli avicoli hanno una distribuzione mondiale e le infezioni sono molto comuni. Nel Regno Unito si segnala una prevalenza del 93 - 96% in allevamenti di polli da carne con problemi di crescita ritardata (Todd et al., 2009). A tal proposito Smyth et al. (2010), tramite l'ausilio della real time RT-PCR, hanno rilevato CAstV e ANV rispettivamente nell'81% e nel 67% dei casi, a partire da campioni di contenuto intestinale prelevati in due gruppi di polli da 0 a 35 giorni con prestazioni sotto la media.

In Italia la situazione non sembra essere diversa. Sono riportati casi, riconducibili ad astrovirus, di enterite e aumento della mortalità in soggetti giovani di pollo, tacchino e faraona nonché di epatite in anatrocchi, maggiormente segnalati in allevamenti intensivi (Canelli et al., 2012).

Questo studio si prefigge l'obiettivo di quantificare la carica virale dei virus oggetto di studio, vista la loro presenza di tipo ubiquitario sul territorio e di valutare il ruolo dell'incubatoio nell'epidemiologia della RSS in Piemonte.

MATERIALI E METODI

Campionamento

I campioni sono stati prelevati tra ottobre 2018 e settembre 2019 presso l'allevamento dei parents per valutare la presenza di Ac verso CAstV ed ANV e successivamente, nell'incubatoio di destinazione delle uova dove si sono verificati dei problemi di schiusa, nascita di pulcini deboli e problemi di accrescimento nell'allevamento di destinazione.

Sono stati prelevati 295 campioni: 100 cartine sporche di feci di pulcino al primo giorno di vita prelevate nelle scatole adibite al loro trasporto; cartine nuove prive di feci e 5 cartine nuove; 20 tamponi ambientali delle varie aree (2 all'interno della cella di incubazione, 2 fuori dalla cella di incubazione, 2 dell'area di stoccaggio uova e 2 dell'area di stoccaggio pulcini); 5 tamponi dell'acqua utilizzata nei diversi impianti di nebulizzazione e dell'acqua di scolo delle celle di incubazione; 60 tamponi eseguiti sulla superficie esterna di uova in attesa di essere incubate (Figura 1); 30 sacchi vitellini di embrioni al 18esimo giorno di incubazione (su scarti del processo di incubazione) (Figura 2); 45 campioni di contenuto intestinale di broiler 1-7 giorni morti in allevamento e provenienti da uno degli allevamenti di destinazione dei pulcini nati in incubatoio.



Fig.1



Fig.2

Elisa Test

I campioni di siero prelevati dai parents sono stati inviati presso un laboratorio analisi IZS Forlì esterno per la ricerca degli Ac verso CAstV ed ANV

Estrazione e real time PCR:

L'Estrazione del RNA è stato effettuato utilizzando il reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific) secondo protocollo e quantificato mediante NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

La One-step RRT-PCR per CAstV ed ANV è stata eseguita in 20µL utilizzando i primers e probe dell'articolo (Smith et al. 2010), inserendo la curva standard per renderla quantitativa. Protocollo : 10µL 2x One Step PCR Mix (sensi Fast Probe HI-ROX one step kit, BIOLINE), 1µL Enzyme Mix (Bioline) containing reverse transcription enzyme e DNA polymerase, 0.35µL CAstV probe (20µM), 0.35µL ASN probe (20µM), 0.4µL CAstV forward primer (20µM), 0.4µL CAstV reverse primer (20µM), 0.4µL ASN forward primer (20µM), 0.4µL ASN reverse primer (20µM), 5µL RNA sample, and 0.3µL RNase-free water. La reazione è stata eseguita nel ABI 7300 real time PCR instrument (Applied Biosystems) con il seguente programma: 15min at 55°C, 5min at 95°C, 40 cycles of 5s at 95°C and 34s at 60°C. Controllo negativo e positivo sono stati inseriti per ogni reazione. I dati sono stati analizzati con 7300 Software (Applied Biosystems). Alcuni campioni positivi sono stati sequenziati presso il servizio esterno di BMR Genomics, Padua, Italy. I frammenti sono stati poi clonati nel vettore procaryote pCR-XL-TOPO Invitrogen, Thermo Fisher Scientific come da protocollo. Dai plasmidi sono state preparate delle diluizioni seriali: 5×10⁵, 5×10⁴, 5×10³, 5×10², 5×10¹, 5×10⁰ copie di DNA/ 5 µL per la curva standard e poter effettuare una quantificazione mediante real time PCR di tipo assoluto.

Sequenziamento NGS:

L'RNA estratto dal campione selezionato è stato utilizzato per la sintesi di double stranded cDNA (Maxima H Minus Double-Stranded cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific, USA).

Il cDNA è stato utilizzato per la preparazione di libreria Illumina (Nextera XT kit, Illumina, San Diego, USA)

Il sequenziamento è stato condotto su piattaforma MiSeq (Illumina, San Diego, USA), utilizzando un sequenziamento paired-end 2x150bp.

RISULTATI

Come prima analisi è stata valutata la presenza di Ac anti CAstV/ANV nei Parents, da cui provengono le uova che hanno dato esito positivo.

Tutti i campioni ambientali prelevati dall'incubatoio sono risultati negativi per CAstV/ANV, insieme ai 60 tamponi effettuati sulla superficie delle uova e le cartine nuove usate come controllo.

88 su 100 carte di trasposto (post utilizzo) sono risultate positive con una carica virale maggiore di 5x10³ per CAstV e circa 4x10³ per ASN. 57 sono risultate positive a CAstV, 11 a ASN 10 co-infettate.

16 su 30 sacchi embrionali al 18 giorno di incubazione sono risultati positivi per CAstV PCR con una carica virale media di 5x10⁴ e 3 per ANV 3x10², di cui 2 mostravano una confezione.

Tutti i contenuti intestinali (1 to 7 days) analizzati sono risultati positive (n=30), 11 su 30 per la ricerca di ANV con carica virale elevata corrispondete ad un numero di copie maggiore di 5×10^5 , 13 positive per CastV con carica virale compresa tra 2×10^1 to 3×10^2 e 6 risultavano co-infetti.

Sequenziamento NGS

Sono state ottenute un totale di 960.618 reads (144Mbp). L'analisi di resequencing ha mostrato come le reads ottenute trovassero la maggiore similarità verso i ceppi di Avian nephritis virus 2.

In particolare un totale di 105 reads hanno trovato corrispondenza verso Avian nephritis virus 2 strain AVE52/ANV2 (MH028405).

La corrispondenza è ristretta alla ORF1, in particolare la ORF1b, mentre nessuna read è stata identificata nella ORF2.

Successive analisi hanno portato alla caratterizzazione di una regione parziale della ORF2 la quale, secondo le similarità ottenute dal paragone con le sequenze parziali disponibili in rete, è simile a Avian nephritis virus 2 isolate ANV-EF91-276-C13 (HQ330485). Considerando la regione del genoma omologa a ORF1b, la similarità tra il ceppo identificato in questo studio e le reference di Avian nephritis virus è pari a 89,4%-86,4%, mentre i ceppi di Chicken astrovirus sono risultati al massimo 59% simili.

DISCUSSIONE

In questo studio è stata ottimizzata una real time di tipo quantitativo per CAstV e ANV da utilizzare per l'analisi di campioni provenienti da un incubatoio con problemi di schiusa e pulcini gracili e problemi di accrescimento nell'allevamento di destinazione. I dati ottenuti mostrano un elevata carica virale di CAstV, rispetto al ANV, nei prelievi di campioni fatti dagli animali presenti in incubatoio, viceversa nei campioni prelevati in allevamento (1-7 giorni) si osserva un netto aumento della carica virale di ANV rispetto a quella di CAstV, probabilmente dovuto al differente tropismo tra ANV e CAstV. Inoltre la bassa carica virale di ANV potrebbe permettere a certe uova di schiudere ed aiuta a spiegare l'elevata carica virale riscontrata in allevamento.

Da campioni prelevati in allevamento è stato possibile ottenere il primo genoma completo di ANV in Italia da pulcini di 1-7 giorni di vita. L'analisi filogenetica rivela l'appartenenza del nuovo ceppo al gruppo di Avian nephritis virus 2. Inoltre un numero inferiore di reads indica chiaramente la presenza di un secondo ceppo virale: in particolare il secondo ceppo risulta maggiormente simile a ceppi di CastV, confermando una possibile coinfezione da parte di virus geneticamente correlati.

Ulteriore obiettivo di questo progetto era quello di valutare il ruolo dell'incubatoio nella trasmissione dell'astrovirus. I dati ottenuti tramite analisi con real-time RT-PCR quantitativa sui campioni ambientali hanno permesso di escludere l'incubatoio tra le fonti di trasmissione virale e di consolidare l'ipotesi di trasmissione verticale di CAstV e ANV. Infatti i virus sono infatti stati identificati a partire da sacchi vitellini prelevati direttamente in ovo al 18esimo giorno di incubazione.

Ulteriori analisi saranno necessarie per chiarire ulteriormente il ruolo epidemiologico dell'incubatoio nella dinamica di trasmissione della RSS e per valutare il tropismo di ANV and CAstT in embrioni ed in pulcini nelle prime settimane di vita.

BIBLIOGRAFIA

1. Canelli E., Cordioli P., Barbieri I., Catella C., Pennelli D., Ceruti R., Moreno A., Lavazza A., (2012). Astroviruses as causative agents of poultry enteritis: Genetic characterization and longitudinal studies on field conditions. *Avian Diseases* 56:173–182.
2. Devaney R., Trudgett J., Trudgett A., Meharg C., Smyth V., (2016). A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting-stunting syndrome and from normal birds. *Avian Pathology* 45(6):616-629.
3. Sajewicz-Krukowska J., Pać K., Lisowska A., Piķuła A., Minta Z., Króliczewska B., Domanska-Blicharz K., (2016). Astrovirus-induced “white chicks” condition – field observation, virus detection and preliminary characterization. *Avian Pathology* 45(1):2-12.
4. Smyth J.A., (2008). Runting/Stunting/Cystic enteritis syndrome. North Carolina Broiler Supervisor’s Short Course 19.
5. Smyth V.J., Jewhurst H.L., Adair B.M., Todd D., (2009). Detection of chicken astrovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 38(4):293-299.
6. Smyth V.J., Jewhurst H.L., Wilkinson D.S., Adair B.M., Gordon A.W., Todd D., (2010). Development and evaluation of real-time TaqMan® RT-PCR assays for the detection of avian nephritis virus and chicken astrovirus in chickens. *Avian Pathology* 39(6):467-474.
7. Smyth V.J., Kaukonen E., Trudgett J., Wylie M., Jewhurst H., Conway B., Welsh M.D., Todd D., (2013). Chicken astrovirus detected in hatchability problems associated with “White Chicks”. *Vet. Rec.* 173:403–404.
8. Todd D., Smyth V.J., Ball N.W., Donnelly B.M., Wylie M., Knowles N.J., Adair B.M., (2009). Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. *Avian Pathology* 38(1):21-29.