

## EVOLUZIONE ANTIGENICA DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE

Cecchinato M.<sup>1\*</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Ricchizzi E.<sup>2</sup>, Brown P.<sup>3</sup>, Spada D.<sup>2</sup>, Naylor C.J.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

<sup>2</sup> *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

<sup>3</sup> *University of Liverpool, Department of Veterinary Pathology, Leahurst, CH64 7TE Neston, United Kingdom*

*\*Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Università di Padova Tel: +39 049 8272968. Fax: +39 049 8272604. E-mail: mattia.cecchinato@unipd.it*

### Introduzione

*Metapneumovirus aviare* (AMPV) è responsabile della Rinotracheite del Tacchino (TRT), e causa importanti perdite economiche in animali non vaccinati. Sono stati sino ad ora identificati, in base alle sequenze nucleotidiche, quattro sottotipi virali denominati A,B,C e D. Alla fine degli anni '80 sono stati messi in commercio vaccini vivi attenuati largamente impiegati per il controllo di tali infezioni. Tuttavia in campo si osservano ancora forme respiratorie dovute da AMPV. Varie ragioni sono state addotte a spiegazione dell'occorrenza di tali focolai tra cui vaccinazione eseguita male, scarsa durata dell'immunità e incompleta protezione tra i sottotipi (Naylor *et al.*, 1997; Van de Zande *et al.*, 2000) o riacquisizione di patogenicità del vaccino stesso (Catelli *et al.*, 2006). Ciò nonostante tali cause non spiegano esaurientemente il verificarsi di focolai di TRT in animali vaccinati correttamente e con vaccino appartenente al medesimo sottotipo virale causa del focolaio.

Dati epidemiologici sulla prevalenza di AMPV in allevamenti di tacchini da carne del Nord Italia hanno messo in evidenza come, dopo l'introduzione della vaccinazione di massa, il numero di positività per AMPV sia complessivamente diminuito negli anni in concomitanza con un aumento del numero di positività osservate in età avanzata (43-90 giorni di età), in gruppi vaccinati col medesimo sottotipo (Catelli, 2006). Il successivo sequenziamento completo del gene di adesione (G) di alcuni isolati responsabili di focolai tardivi in gruppi vaccinati, ha permesso di distinguerli nettamente dal ceppo vaccinale e da tutti i ceppi di AMPV italiani isolati prima del 2001 (Cecchinato *et al.*, 2007).

Allo scopo di determinare se le mutazioni osservate nei ceppi "più recenti" siano state sufficienti al virus per eludere l'immunità vaccinale è stata eseguita un'infezione sperimentale in tacchini vaccinati, inoculandoli con un ceppo isolato nel 2004 o con un ceppo del 1987, e valutando la protezione mediante misurazione della sintomatologia clinica e dell'eliminazione virale.

### Materiali e metodi

**Vaccino.** Un vaccino vivo attenuato, costituito da AMPV sottotipo B, è stato somministrato mediante via oculare agli animali rispettando la dose raccomandata dalla ditta produttrice.

**Virus.** Per il challenge sono stati utilizzati: AMPV sottotipo B IT/Ty/Vr240/87 e IT/

Ty/205-16/04 isolati in Italia, rispettivamente nel 1987 e nel 2004, alla dose di 3.6 log<sub>10</sub> CD<sub>50</sub>/soggetto.

**Tacchini.** Sono stati utilizzati tacchini commerciali di un giorno di vita, non vaccinati per AMPV, provenienti da un incubatoio che applica misure di biosicurezza elevate.

**Piano sperimentale.** I tacchini sono stati identificati con anello numerato al piede e introdotti in 3 differenti isolatori per pollame in numero di: 20 nell'isolatore A, 20 nell'isolatore B e 10 nell'isolatore C (controllo negativo). Ad un giorno di vita i tacchini dell'isolatore A sono stati vaccinati mentre gli altri (isolatori B e C) sono stati inoculati con acqua sterile. A 20 giorni di vita, metà dei tacchini dell'isolatore A sono stati scambiati con un egual numero di animali dell'isolatore B. Il giorno successivo i tacchini dell'isolatore A sono stati sottoposti ad infezione di prova con il ceppo IT/Ty/205-16/04, quelli dell'isolatore B con IT/Ty/Vr240/87 e i controlli inoculati con acqua sterile. Nei giorni successivi, sino al 12° giorno post-infezione (p.i.), in tutti i soggetti, è stata valutata la sintomatologia clinica. Dal 3° all'11° giorno p.i. sono stati eseguiti tamponi oro-faringei per valutare l'eliminazione virale mediante RT-PCR. Al 13° giorno p.i. tutti gli animali sono stati umanamente soppressi.

#### **Misurazione della sintomatologia clinica.**

La sintomatologia clinica è stata misurata seguendo il metodo descritto da Naylor e Jones (1994), assegnando un punteggio ad ogni animale secondo la seguente scala:

- 0 nessun sintomo;
- 1 scolo nasale limpido;
- 2 scolo nasale torbido;
- 3 rigonfiamento dei seni infraorbitali e/o essudato schiumoso oculare.

I soggetti che hanno mostrato punteggi  $\geq 2$  sono stati considerati affetti da sintomatologia grave.

**RT-PCR per AMPV.** L'estrazione dell'RNA e la RT-nested PCR sono state eseguite come descritto da Cavanagh *et al.* (1999). Ciascun tampone oro-faringeo è stato processato individualmente.

#### **Risultati**

Sei soggetti su 10 del gruppo vaccinato ed inoculato con AMPV del 2004 hanno mostrato sintomatologia clinica grave, contrariamente a quanto osservato nel gruppo vaccinato ed inoculato con AMPV del 1987, dove in nessun soggetto sono stati registrati punteggi  $\geq 2$ .

I risultati preliminari degli esami di RT-PCR per AMPV, riguardanti i campioni prelevati dai tacchini vaccinati, nei giorni 3 e 4 post-challenge, mostrano come abbia eliminato virus il 70% degli inoculati col AMPV del 2004 e solo il 30% di quelli inoculati con AMPV del 1987.

Come atteso, in tutti i tacchini non vaccinati e sottoposti a infezione di prova, sia con AMPV del 1987 che del 2004, è stata evidenziata sintomatologia grave ed eliminazione virale. Il gruppo C (controllo negativo) non ha mostrato nessun sintomo.

## Discussione

I risultati di questo studio dimostrano come un ceppo di AMPV Italiano di recente isolamento abbia acquisito la capacità di eludere l'immunità indotta dalla vaccinazione. L'analisi della sequenza nucleotidica del gene G del ceppo IT/Ty/205-16/04 sottotipo B isolato in Italia nel 2004 ha mostrato numerose mutazioni rispetto al vaccino (Cecchinato *et al.*, 2007). La maggior parte di queste mutazioni coinvolgono amminoacidi che posseggono una carica (K, R, D, E and H) o che possono essere glicosilati durante il processo di modificazione post-traduzione (S e T), quindi potenzialmente in grado di determinare cambiamenti antigenici. Il ceppo vaccinale mostra invece un alto livello di omologia con i ceppi isolati in Italia e nel resto dell'Europa alla fine degli anni '80 (Cecchinato *et al.*, 2007), spiegando la maggiore resistenza dei soggetti vaccinati all'infezione di prova con il ceppo del 1987, osservata nel nostro studio.

E' probabile che AMPV sia evoluto in regioni antigeniche fondamentali e che ciò gli permetta la circolazione anche in gruppi correttamente vaccinati.

## Bibliografia

- Catelli E. (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da Pneumovirus Aviare in Italia. Giornata di Studio INTERVET "Malattie respiratorie e problemi di produzione" 7 giugno 2006, Bologna, Italia. pp. 19-23.
- Catelli E., Cecchinato M., Savage C.E., Jones R.C., Naylor, C.J. (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine*, 24, 6476-6482.
- Cavanagh D., Madwitt K., Britton P., Naylor, C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.
- Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Sperati Ruffoni L., Pesente P., Piccirillo A., Franciosi C., Naylor, C.J. (2007). Sequence analysis of fusion (F) and attachment (G) protein genes of Avian *Metapneumovirus* strains isolated in Italy. In: *Proceedings of the 15<sup>th</sup> World Veterinary Poultry Congress*, Beijing, China. p. 187.
- Naylor C.J., Jones R.C. (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine*, 12, 1225-1230.
- Naylor C., Shaw K., Britton P., Cavanagh, D. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26, 327-338.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Naylor C.J., Pensaert M. (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Veterinary Record*, 147, 132-134.