

FOCOLAIO DI RINOTRACHEITE INFETTIVA DEL TACCHINO (TRT), DA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* DI ORIGINE VACCINALE, IN TACCHINI DI 7 SETTIMANE.

Ricchizzi E.^{1*}, Lupini C.¹, Cecchinato M.², Brown P.³, Naylor C.J.³, Catelli E.¹

¹ *Università di Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italy*

² *Università di Padova, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata ed Igiene Veterinaria, Agripolis - Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy*

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

**Corresponding author: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna. Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italy – Tel. +39 051 2097074- Fax: +39 051 2097039 – Email enrico.ricchizzi2@unibo.it*

Introduzione

Il *Metapneumovirus Aviare* (AMPV) è un virus a RNA appartenente alla famiglia Paramyxoviridae, genere *Metapneumovirus*, in grado di determinare infezioni delle prime vie respiratorie nel tacchino e nel pollo. Il confronto delle sequenze nucleotidiche ha permesso di distinguere 4 sottotipi virali (A, B, C e D) (Cook, 2000). Indagini epidemiologiche di campo svolte in Italia hanno evidenziato una netta prevalenza del sottotipo B sin dalla prima comparsa dell'infezioni nel 1987. Per il controllo di AMPV, nel nostro Paese, a partire dagli anni '90, è stata introdotta la vaccinazione; eseguita prevalentemente col sottotipo B ed in misura minore col sottotipo A, sebbene, sino al 2003, non ci fossero evidenze della presenza di AMPV/A in Italia (Catelli *et al.*, 2004).

I vaccini vivi attenuati conferiscono una buona protezione ma la loro instabilità può portarli a riacquisire virulenza anche dopo un limitato numero di retropassaggi. Sperimentalmente è stato dimostrato che sono sufficienti 4-10 retropassaggi su animali sensibili (Naylor *et al.* 1994). Uno studio successivo ha dimostrato come ciò può avvenire anche in allevamento. Animali vaccinati al primo giorno di vita in incubatoio con un sottotipo A hanno mostrato, dopo 3 settimane, una forma respiratoria durante la quale è stato isolato un AMPV sottotipo A. Il sequenziamento dell'intero genoma virale e l'identificazione di 9 nucleotidi *marker* vaccinali ne ha dimostrato l'inequivocabile origine vaccinale (Catelli *et al.*, 2006).

In questo lavoro viene riportato un focolaio di TRT verificatosi in Italia nel 2003, dovuto ad AMPV sottotipo A di origine vaccinale che ha interessato tacchini di 7 settimane vaccinati con un sottotipo B.

Materiali e metodi

Allevamento. Il focolaio di TRT riportato in questo studio si è verificato in un allevamento di tacchini da carne. Tutti gli animali erano stati vaccinati a 7 giorni di vita per via oculo-nasale con un vaccino vivo attenuato del sottotipo B. In allevamento erano presenti 4 gruppi, di 4000-5000 maschi ciascuno. Essi hanno mostrato i primi sintomi respiratori, caratterizzati da starnuti, scolo nasale ed oculare, e difficoltà respiratoria, a circa 45 giorni di

età. La forma respiratoria, che è stata complicata da infezioni secondarie, ha gradualmente interessato tutti i gruppi causando una mortalità totale del 10-11%.

Campionamento. Il campionamento è stato eseguito in 2 gruppi, da 10 soggetti per gruppo, che mostravano i primi sintomi respiratori. Da ogni animale sono stati eseguiti due tamponi rinofaringei, uno per isolamento virale e l'altro per RT nested-PCR. I tamponi per RT nested-PCR sono stati lasciati asciugare all'aria per 30 minuti quindi conservati a temperatura ambiente sino alla processazione. Quelli destinati all'isolamento virale sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di ghiaccio fondente sino al momento della preparazione dell'inoculo. I tamponi sono stati processati in pool di 10.

RT nested-PCR. Per evidenziare e tipizzare AMPV dai tamponi a secco e confermare l'isolamento virale, è stata impiegata una RT nested-PCR sottotipo A e B specifica (Cavanagh *et al.*, 1999).

Isolamento virale. L'isolamento di AMPV è stato eseguito su colture di anelli tracheali di embrioni di pollo (Catelli *et al.*, 1998). Le colture erano ritenute positive se si osservava ciliostasi entro 10 giorni dall'inoculazione. La conferma dell'isolamento e la tipizzazione del ceppo è stata eseguita mediante RT nested-PCR.

Caratterizzazione molecolare del ceppo di AMPV. Il genoma del virus isolato è stato amplificato nelle regioni contenenti i 9 marker vaccinali identificati da Catelli *et al.* (2006), secondo la metodica ivi descritta.

Valutazione della patogenicità del ceppo di AMPV

Allo scopo di valutare la patogenicità del ceppo AMPV isolato durante questo studio e denominato 259-01/03, è stata condotta un'infezione sperimentale in condizioni d'isolamento biologico. Trenta tacchini di un giorno di vita, non vaccinati per AMPV e provenienti da un incubatoio che applica misure di biosicurezza elevate, sono stati divisi in gruppi di dieci e alloggiati in tre isolatori per pollame. Un gruppo è stato inoculato con 3,5 Log₁₀ ID₅₀ per animale, del ceppo 259-01/03. Un altro è stato inoculato con il vaccino sottotipo A caratterizzato da Catelli *et al.* (2006) ad una dose per soggetto 10 volte superiore a quella consigliata dalla casa produttrice; l'ultimo è stato inoculato con acqua sterile e tenuto come controllo negativo. In tutti i gruppi, giornalmente, dal 1° al 14° giorno post infezione, è stata valutata la sintomatologia clinica assegnando un punteggio, per ogni animale, secondo la seguente scala: 0 = assenza di sintomi; 1 = scolo nasale limpido; 2 = scolo nasale torbido; 3 = rigonfiamento dei seni infra-orbitali o essudato schiumoso oculare.

Risultati

Da un gruppo di tacchini con sintomatologia clinica di TRT è stato isolato su TOC, ed identificato mediante RT nested-PCR, un ceppo AMPV sottotipo A, denominato 259-01/03, che all'infezione sperimentale si è mostrato patogeno (figura 1). La sequenza nucleotidica di questo ceppo, in otto delle nove posizioni *marker* vaccinali identificate da Catelli *et al.* (2006) (tabella 1), risultava identico al vaccino, mentre in posizione 3.553, posizione *marker* mancante, era uguale al ceppo genitore.

Discussione

Confermando un precedente lavoro (Catelli *et al.*, 2006) è stato in questo studio isolato un AMPV sottotipo A di origine vaccinale in grado di causare in campo sintomatologia respiratoria caratteristica della TRT e patogeno all'infezione sperimentale. Tuttavia in quest'occasione il virus è stato isolato in un allevamento nel quale non era stata effettuata vaccinazione con AMPV del sottotipo omologo. Esso quindi, verosimilmente, è stato introdotto dall'ambiente esterno o, ipotesi meno probabile, ha persistito nell'ambiente da una precedente vaccinazione con sottotipo A.

La presenza di otto *marker* vaccinali su nove dimostra incontrovertibilmente che il ceppo isolato è di origine vaccinale, e l'infezione sperimentale ne conferma la patogenicità. La mutazione in posizione nucleotidica 3.553 potrebbe essere legata al processo di riacquisizione di patogenicità e richiede ulteriori approfondimenti. Poiché il gruppo era stato vaccinato con AMPV sottotipo B, un'altra conferma emerge dallo studio, relativa al fatto che la cross-protezione fra sottotipi è limitata (Van de Zande *et al.*, 2000).

Bibliografia

Catelli E., Cook J.K.A., Chester J., Orbell S.J., Woods M.A., Baxendale W., Huggins M.B. (1998) The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian Pneumovirus in chickens. *Avian Pathology*, 27, 632-640.

Catelli E., Cecchinato M., Ortali G., De Matteo P., Savage C.E., Jones R.C., Naylor C.J (2004). *Avian Pneumovirus in Italy*. Proceedings of the 4th International Symposium on Avian Corona and Pneumovirus Infections, Rauischholzhausen, Germany, 20-24 June 2004. WB Lauferweiler Verlag, Wettemberg, Germany, 2004, pp. 275-281.

Catelli E, Cecchinato M, Savage CE, Jones RC, Naylor CJ (2006). Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine*, 24, 6476-6482.

Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor CJ (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28, 593-605.

Cook J.K.A. (2000). Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal*, 160, 118-125.

Naylor CJ, Jones RC (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine*, 12(13), 1225-30.

Van de Zande S, Nauwynck H, Naylor CJ, Pensaert M (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *The Veterinary Records*, 147, 132-4

Tabella 1: *Marker* vaccinali: nucleotidi e posizione genomica.

Posizione§ Genomica	Ceppo* progenitore	Ceppo* Vaccinale	Ceppo 259-01/03
2.941	U	A	A
3.553	U	C	U
3.825	G	A	A
5.055	A	G	G
5.140	U	C	C
5.929	A	G	G
6.358	U	C	C
10.022	U	G	G
11.624	U	C	C

§ in senso antigenomico

* da Catelli *et al.*, 2006