

EVIDENZE SPERIMENTALI DELLA RESISTENZA DEL PICCIONE (*COLUMBA LIVIA*) ALL'INFEZIONE DA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* E DELLA SUA IRRILEVANZA NELLA TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE AL TACCHINO

Catelli E.¹, Lupini C.¹, Listorti V.¹, Marziali A.¹, De Matteo P.¹, Naylor C.J.², Cecchinato M.³

¹*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna - Via Tolara di Sopra, 5. 40064 Ozzano Emilia (BO) – ITALIA*

²*Department of Infection Biology Institute of Infection and Global Health - Faculty of Health and Life Sciences, Leahurst Campus, University of Liverpool CH64 7TE - UK*

³*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16. 35020 Legnaro (PD), ITALIA*

Summary

Avian metapneumovirus (AMPV) causes an upper respiratory tract infection in turkeys leading to turkey rhinotracheitis. In other avian species, including chickens, it is also involved in the etiology of multifactorial diseases such as swollen head syndrome. Sensitivity of wild birds to AMPV and their role in maintaining and spreading the virus to poultry is still a matter of debate. Recently the sensitivity of pigeons to AMPV of subtype A or B has been claimed, based on very limited PCR detections from wild or experimentally infected birds. In order to have conclusive evidence regarding the sensitivity of pigeons to AMPV of subtype B and its role in spreading the virus to turkeys, two experimental trials were planned in secure isolation conditions. In trial 1 two isolators were modified to host turkeys and pigeons in the same environment, separated only by a net. Drinkers were shared between groups. Pigeons were infected with AMPV and housed in one isolator with naïve turkeys. Similarly turkeys were infected and housed with naïve pigeons. Additional turkeys and pigeons were kept in different isolators as uninfected controls. Post-infection clinical signs, virus shedding and immune response were assessed for three weeks. In trial 2, commercial two-weeks old turkeys were divided in two groups and housed in two different isolators. Birds in isolator A were challenged as previously described. Four days post-infection, 7 weeks old naïve pigeons were introduced in the isolator A and kept with the infected turkeys for 24 hours, then removed, sprayed with 0,5 % of Virkon S® solution. After 10 minutes, pigeons were rinsed with water, dried, and introduced in the isolator B, where 10 naïve turkeys were housed. Clinical sign were monitored for 10 days. Pigeons were found refractory to AMPV experimental infection and neither able to spread the virus to naïve turkeys. Our paper shows that pigeons are highly unlikely to play any relevant role in the environmental spread of subtype B AMPV. Pigeons are not biological vector or reservoir species for AMPV subtype B.

INTRODUZIONE

In che misura specie di volatili diverse da tacchino, pollo, fagiano e faraona siano sensibili al Metapneumovirus aviare (AMPV) sottotipo A e B, e che ruolo abbiano gli uccelli selvatici nel mantenere e diffondere l'infezione nell'ambiente, sono argo-

menti ancora oggetto di studio ed approfondimento da parte della comunità scientifica. La prima comparsa del virus in Sud Africa e la sua successiva diffusione in Israele ed Europa hanno avuto modalità che fanno sospettare che gli uccelli migratori, e gli uccelli selvatici in generale, abbiano giocato un ruolo importante nella trasmissione dell'infezione (Jones, 1996). Gli studi epidemiologici sulla diffusione di AMPV sottotipo A e B negli uccelli selvatici, se paragonati a quelli svolti in USA sul sottotipo C, sono scarsi e riportano una limitata presenza dell'infezione. Studi pubblicati negli anni '90 riportano l'evidenza di anticorpi nei riguardi di questi sottotipi in allevamenti di struzzi dello Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994) ed in gabbiani della costa Baltica in Germania (Heffels- Redman *et al.*, 1998). Più recentemente uno studio brasiliano riporta l'evidenza di RNA virale di AMPV in uccelli selvatici tenuti in cattività (Felippe *et al.*, 2011). Un'ampia indagine epidemiologica svolta nel 2004 in zone paludose dell'Italia nord-orientale, ha riportato al contrario costantemente negatività sia sierologiche che molecolari per infezione da AMPV sottotipo A e B in molte specie di uccelli acquatici (Delogu *et al.*, 2004). L'anatra, l'oca ed il piccione sono risultati resistenti all'infezione sperimentale con AMPV sottotipo A (Gough *et al.*, 1988); mentre l'anatra muta sia all'infezione con AMPV A che B (Toquin *et al.*, 2006).

Il coinvolgimento del piccione nella diffusione di AMPV sottotipo A e B è stato recentemente nuovamente sospettato, sulla base di scarse positività molecolari evidenziate in piccioni selvatici o infettati sperimentale (Felippe *et al.*, 2011; Gharaibeh & Shamoun, 2011). Il presente lavoro ha avuto come obiettivi da un canto determinare con certezza la sensibilità del piccione ad AMPV sottotipo B e dell'altro verificare la sua rilevanza nel trasmettere l'infezione al tacchino. A tale scopo sono state svolte prove due sperimentali in isolamento biologico.

MATERIALI E METODI

Prova sperimentale n. 1

39 tacchini da carne di una settimana di vita e 45 piccioni di 7 settimane di vita sono stati divisi in 6 gruppi ed accasati in 4 isolatori per pollame. Due isolatori (A e B) sono stati previamente modificati in modo tale che in ciascuno potessero essere ospitati, nello stesso ambiente e separati solo da una rete, un gruppo di tacchini ed uno di piccioni. In questi isolatori gli abbeveratoi erano in comune. Negli altri due isolatori erano alloggiati rispettivamente il gruppo dei tacchini (T) e dei piccioni (P) di controllo.

Il primo gruppo di 13 tacchini (TI) è stato sottoposto ad infezione sperimentale tramite goccia nell'occhio con il ceppo AMPV sottotipo B It/Ty/Vr240/87. L'operazione è stata svolta in una stanza separata e solo successivamente il gruppo è stato alloggiato nell'isolatore A assieme a 16 piccioni non infetti (PC). Analogamente 16 piccioni sono stati infettati (PI) e successivamente alloggiati nell'isolatore B con 13 tacchini non infetti (TC).

Questa procedura è stata utilizzata per evitare che l'ambiente degli isolatore in cui le due specie erano alloggiate assieme fosse contaminato durante l'infezione sperimentale.

La dose infettante è stata di $3,7 \log_{10} \text{CD}_{50}$ in entrambi i casi. Dal primo all'11° giorno

post-infezione gli animali sono stati osservati quotidianamente per eventuale insorgenza di sintomatologia clinica riferibile ad AMPV. E' stato assegnato un punteggio a ciascun animale a seconda della gravità della sintomatologia clinica: **0** nessun sintomo; **1** scolo nasale limpido; **2** scolo nasale torbido; **3** rigonfiamento dei seni infraorbitali e/o essudato schiumoso oculare (Naylor & Jones, 1994). La normalità della distribuzione campionaria è stata prima valutata mediante il test Kruskal–Wallis non-parametric one-way ANOVA.

I confronti fra i gruppi sono stati condotti utilizzando il test U di Mann–Whitney. Da 10 soggetti per gruppo, nei giorni 0, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 14 e 16 post infezione sono stati raccolti tamponi rino-faringei allo scopo di valutare l'eliminazione virale di AMPV mediante Real time RT-PCR (RRT-PCR) per AMPV sottotipo A e B specifica (Cecchinato *et al.*, 2012). Allo stesso modo sono stati analizzati per presenza di RNA virale, alcuni campioni dell'acqua di bevanda condivisa fra piccioni e tacchini negli isolatori A e B, raccolti ai giorni 4 e 5 post infezione. Inoltre, nei giorni 3, 5 e 7 post-infezione sono stati sacrificati due piccioni dai gruppi PC e PI ed un tacchino dai gruppi TI e TC; un piccione e un tacchino dai gruppi di controllo. Al fine di determinare la distribuzione virale di AMPV in alcuni tessuti target sono stati prelevati da questi animali e sottoposti a RRT-PCR per AMPV campioni di congiuntiva, turbinati nasali, trachea e ghiandola di Harder. Esami sierologici per AMPV sono stati eseguiti da 10 soggetti per gruppo ai giorni 0 e 21 post-infezione mediante un kit ELISA blocking del commercio (Avian Pneumovirus SVANOVIR®, Svanova). Tale test permette di evidenziare anticorpi indipendentemente dalla specie in esame.

Prova sperimentale n. 2

20 tacchini da carne di due settimane di vita sono stati divisi in due gruppi ed alloggiati in due isolatori per pollame. Il gruppo alloggiato nel primo isolatore è stato sottoposto ad infezione con AMPV come descritto nella prova sperimentale 1. A 4 giorni dall'infezione, nel momento in cui la carica virale eliminata nell'ambiente dai tacchini infetti è massima, sono stati introdotti nell'isolatore 5 piccioni di 7 settimane di vita e tenuti a contatto con i tacchini infetti. Dopo 24 ore i piccioni sono stati rimossi, aspersi con una soluzione virulicida di Wirkon S® 0,5 % allo scopo di inattivare ogni traccia di virus dalla superficie esterna dei soggetti. Dopo 10 minuti i piccioni sono stati sciacquati con abbondante acqua pulita, accuratamente asciugati, e quindi introdotti nel secondo isolatore dove era alloggiato il secondo gruppo di 10 tacchini rimasti non infetti. Tacchini e piccioni sono stati allevati assieme per 10 giorni, durante i quali quotidianamente veniva valutata la sintomatologia clinica secondo il metodo descritto nella prova precedente.

RISULTATI

Prova sperimentale n. 1

Nelle figure 1 e 2 sono riportate le medie giornaliere della sintomatologia clinica osservate nei gruppi sperimentali. I tacchini sottoposti a infezione sperimentale hanno mostrato un andamento della sintomatologia clinica tipico dell'infezione da AMPV, con differenze statisticamente significative rispetto a tutti gli altri gruppi sperimen-

tali. I piccioni infettati sperimentalmente con AMPV hanno mostrato una lievissima sintomatologia non differente in modo statisticamente significativo da quella osservata nei piccioni tenuti a contatto con i tacchini infetti o nei piccioni di controllo. Nella tabella 1 sono riportati i risultati dell'eliminazione virale nei gruppi sperimentali. I tacchini infetti hanno eliminato il virus, come prevedibile, sino all'11° giorno post-infezione. I piccioni tenuti in contatto con questi, nell'isolatore A, sono risultati positivi ugualmente ma in numero minore e per un periodo più breve. L'RNA virale è stato evidenziato nell'acqua da bere condivisa fra questi due gruppi. Interessante notare che, se si va a valutare la quantità di virus rinvenuta nei tamponi rinofaringei, si evidenzia nei tacchini una quantità di virus di 3.000 volte superiore a quella rinvenuta dai piccioni. Non si è mai avuta ri-eliminazione virale nei piccioni infettati sperimentalmente e tanto meno nei tacchini posti a contatto con essi o nell'acqua di bevanda condivisa fra questi due gruppi. La distribuzione del virus nei tessuti (Tabella 2) ha avuto un andamento che riflette l'eliminazione virale nei tamponi: il virus è stato evidenziato costantemente nei tacchini infettati sperimentalmente, ed in un campione di trachea di un piccione del gruppo in contatto con questi. Anche in questo caso la quantità di virus evidenziata nel piccione è risultata essere molto bassa. Sempre negativi per AMPV sono risultati i tessuti sia dei piccioni infettati sperimentalmente che dei tacchini tenuti in contatto con essi. I piccioni sono risultati negativi sierologicamente per AMPV sia prima che dopo l'infezione sperimentale, mentre tutti i tacchini sono risultati sempre positivi, probabilmente anche per la presenza della immunità materna.

Prova sperimentale n. 2

Non sono stati osservati mai sintomi clinici nel gruppo di tacchini sensibili tenuti per 10 giorni con piccioni precedentemente messi in contatto per 24 ore con tacchini infettati sperimentalmente.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati della prima prova hanno mostrato che il piccione non è sensibile alla infezione sperimentale con AMPV alla dose di $3,7 \log_{10}$. Gli animali non hanno infatti mostrato sintomi clinici né risposta immunitaria specifica, e non si è avuta né eliminazione virale respiratoria, né diffusione del virus nei tessuti target esaminati.

Quando invece i piccioni sono stati tenuti in stretto contatto con tacchini infettati sperimentalmente, è stato possibile evidenziare tracce di RNA virale nei tamponi rinofaringei e nella trachea di un soggetto. Tali positività sono probabilmente da considerarsi l'esito del contatto dei piccioni con l'acqua di bevanda contaminata dai tacchini. Anche il gruppo di piccioni contatto, analogamente al gruppo infettato sperimentalmente, non ha mostrato sintomi clinici né sieroconversione.

I risultati della seconda prova sperimentale hanno confermato questi risultati. E' stato infatti dimostrato che piccioni tenuti in stretto contatto con tacchini infetti non sono in grado di trasmettere l'infezione a tacchini sensibili.

In conclusione si può affermare che i piccioni non sono sensibili all'infezione con AMPV sottotipo B. I nostri risultati confermano quanto già affermato per AMPV sottotipo A da Ghouse *et al.* (1988). I piccioni si possono contaminare quando tenuti

a contatto per lunghi periodi con tacchini infetti ma, se spostati dall'ambiente contaminato e messi in contatto con tacchini sensibili, non sono in grado di trasmettere a questi ultimi l'infezione. Il nostro lavoro dimostra che è davvero improbabile che il piccione giochi un ruolo rilevante nella diffusione di AMPV sottotipo B. Il piccione non è quindi vettore biologico né tanto meno specie reservoir per AMPV sottotipo B. Saranno necessari ulteriori studi per definire se esistano specie selvatiche reservoir per AMPV sottotipo A e B, e quali esse siano.

BIBLIOGRAFIA

Cadman HF, Kelly PJ, Zhou R, Davelaar F and PR Mason (1994). A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Diseases* 38(3): 621-625.

Cecchinato M, Lupini C, Munoz Pogoreltseva OS, Listorti V, Mondin A and E Catelli (2012). Development of a one-step real time RT-PCR assay for the detection, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtype A and B. VII International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. Rauschholzhhausen, Germany, 18-21 June 2012.

Delogu M, De Marco MA, Catelli E, Cecchinato M, Sperati RL, Pesente P and C Franciosi (2004). Molecular and serological survey of avian pneumovirus infection in wild aquatic birds in Italy. Proceedings of the IV. International symposium on avian corona and pneumovirus infections. Rauschholzhhausen, Germany, 20-23 June 2004. pp. 282-286.

Felippe PA, Silva LH, Santos MB, Sakata ST and CW Arns (2011). Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology* 40(5):445-452.

Gharaibeh S and M Shamoun (2012). Avian metapneumovirus subtype B experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows, and pigeons. *Veterinary Pathology* 49(4):704-709.

Gough RE, Collins MS, Cox WJ and NJ Chettle (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Veterinary Records* 123(2): 58-59.

Heffels-Redman U, Neuman U, Braune S, Cook JKA and J Pruter (1998). Serological evidence for susceptibility of seagulls to avian pneumovirus (APV) infection. Proceedings of the international symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infection in poultry. Rauschholzhhausen, Germany, 15-18 June 1998. pp. 23-25.

Jones RC (1996). Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. *Avian Pathology* 25(4): 639-648.

Naylor CJ and Jones RC (1994). Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. *Vaccine* 12(13):1225-1230.

Toquin D, Guionie O, Allee C, Morin Y, Le coq L, Zwingelsteinn F, Jestin V and N Eterradossi (2006). Compared susceptibility of SPF ducklings and SPF turkeys to the infection by Avian Metapneumoviruses belonging to the four subgroups. Proceedings of the V. International symposium on avian corona- and pneumoviruses and complicating pathogens. Rauishholzhausen, Germany, 14-16 May 2006. pp. 70-76.

Figura 10. Media giornaliera della sintomatologia clinica osservata nei gruppi Tacchini infetti (TI), Tacchini Contatto (TC) e Tacchini Controllo (T)

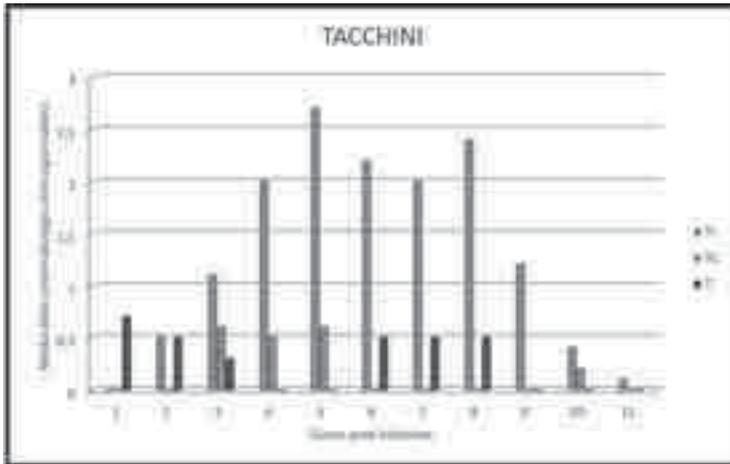


Figura 11. Media giornaliera della sintomatologia clinica osservata nei gruppi Piccioni infetti (PI), Piccioni Contatto (PC) e Piccioni Controllo (P)

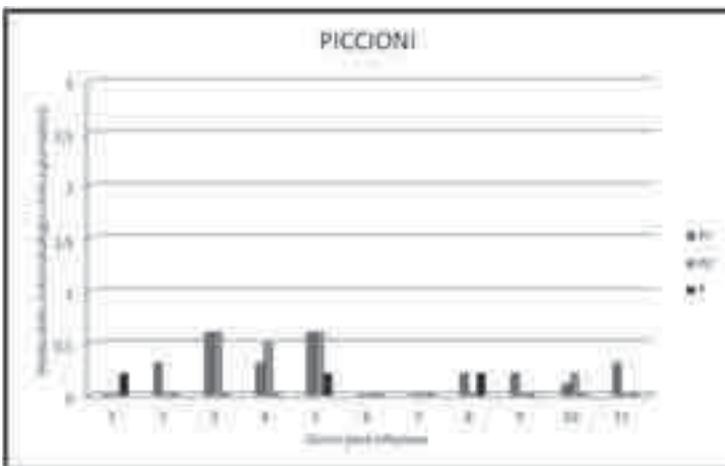


Tabella 1. PROVA SPERIMENTALE 1 – Risultati di RRT-PCR per AMPV nei tamponi respiratori.

Giorni Post-infezione	Isolatore A			Isolatore B			CONTROLLI	
	TI*	PC [§]	H ₂ O	PI [#]	TC ^{&}	H ₂ O	Piccioni	Tacchini
2	10/10 [¶]	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/8	0/4
4	9/10	7/10	+	0/10	0/10	-	0/7	0/3
5	9/10	4/10	+	0/10	0/10	-	0/7	0/3
7	6/10	2/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/6	0/2
9	1/10	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
11	1/10	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
14	0/10	1/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
16	0/10	0/10	n.e.	0/10	0/10	n.e.	0/5	0/1
TOTAL	36	14	/	0	0	/	0	0

* TI: Tacchini infetti

§ PC: Piccioni contatto

PI: Piccioni infetti

& TC: Tacchini contatto

¶ n. positivi/n.campionati

|| Non eseguito

Tabella 2 PROVA SPERIMENTALE 1 – Risultati della RRT-PCR per AMPV nei tessuti.

GRUPPI	3 giorni post-infezione				5 giorni post-infezione				7 giorni post-infezione			
	Trachea	Turbinati Nasali	Congiuntiva	Chiodola di Harder	Trachea	Turbinati Nasali	Congiuntiva	Chiodola di Harder	Trachea	Turbinati Nasali	Congiuntiva	Chiodola di Harder
Tacchini Infetti	1/1*	1/1	1/1	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	1/1	1/1
Piccioni contatto	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Piccioni Infetti	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Tacchini contatto	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Piccioni controllo	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	n.e. [†]	n.e.	n.e.	n.e.
Tacchini controllo	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.

* 1. Positivo, 0. Negativo

† Not detected