

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE (AMPV) ISOLATO IN CORSO DI FORMA RESPIRATORIA NELLA FARAONA

Cecchinato M.¹, Morandini E.², Listorti V.³, Lupini C.³, Pesente P.², Giovanardi D.², Rossi G.², Sperati Ruffoni L.², Catelli E.³

¹*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), ITALIA*

²*Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi, 5 - 37132 - San Michele Extra, Verona – ITALIA*

³*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum Università di Bologna Via Tolara di Sopra, 5 - 40064 Ozzano Emilia (BO) – ITALIA*

Summary

An outbreak of Avian metapneumovirus (AMPV) infection in Guinea fowl is reported in Northern Italy. A subtype B AMPV strain, named aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12, was isolated and sequenced in F and G genes. Phylogenetic analysis showed that the isolate clustered together with other AMPVs of subtype B isolated in Italy from 2001. The factors involved in determining the outbreak are discussed.

INTRODUZIONE

Metapneumovirus aviare (AMPV), virus a RNA a singolo filamento e polarità negativa, appartenente alla famiglia delle *Paramyxoviridae*, colpisce principalmente il tacchino causando un'infezione delle prime vie respiratorie, nota come Rinotracheite del tacchino (TRT).

Pollo (Catelli *et al.*, 1998), fagiano (Catelli *et al.*, 2001), faraona (Picault *et al.*, 1987) ed anatra muta (Toquin *et al.*, 1999) sono ugualmente sensibili all'infezione, anche se in grado minore e diversamente a seconda della specie. In particolare nella faraona sono stati riportati focolai di Sindrome della Testa Gonfia (SHS), analogamente a quanto osservato nel pollo, da cui è stato isolato il virus (Kles *et al.*, 1987). In condizioni sperimentali non è stato possibile riprodurre forme cliniche analoghe a quelle osservate in campo, ma è stata osservata risposta anticorpale specifica (Gough *et al.*, 1988).

Nel presente lavoro viene descritto un focolaio d'infezione da AMPV verificatosi all'inizio del 2012 in un allevamento di faraone da carne della provincia di Verona. Viene riportata la caratterizzazione molecolare del ceppo virale isolato e discussi i possibili fattori condizionanti il manifestarsi di forme cliniche.

MATERIALI E METODI

Allevamento e focolaio

Il focolaio oggetto dello studio si è verificato nel febbraio 2012 in un allevamento di faraone da carne, sito a Roverchiara (VR) ed appartenente ad una grossa azienda avicola italiana. Le faraone erano vaccinate nei riguardi della Malattia di Newcastle ad 1 giorno di vita. L'allevamento era costituito da due capannoni (A e B), in ciascuno dei quali erano accasati circa 10.000 soggetti. All'arrivo in allevamento il

veterinario notava che la ventilazione dei capannoni era stata ridotta per far fronte alle rigidità climatiche del momento. Nel gruppo alloggiato nel capannone A, a circa 10 settimane di vita, si è manifestata una sintomatologia caratterizzata da scolo nasale, congiuntivite, lacrimazione e tendenza a tenere gli occhi chiusi. In alcuni soggetti era presente rigonfiamento ed edema sottocutaneo dell'area periorbitaria (Fig. 1). Il consumo alimentare risultava ridotto. Tale sintomatologia ha mostrato una regressione dopo trattamento antibiotico e la mortalità è stata dello 0,01%.

Campionamento.

Da entrambi i gruppi, sia da quello in cui era evidente sintomatologia clinica (A) che dall'altro (B), sono stati prelevati tamponi rinofaringei per isolamento virale e Realtime RT-PCR (qRT-PCR) per AMPV. Considerando che l'infezione da AMPV ha morbilità che facilmente raggiunge il 100% (Stuart, 1989) e quindi prevalenze attese sicuramente superiori al 30%, e che la popolazione di ciascun gruppo era di 10.000 soggetti, 10 campioni/gruppo erano sufficienti per evidenziare l'infezione con un livello di confidenza del 95% (Cannon e Roe, 1982).

Sono stati quindi selezionati 20 soggetti (10 con sintomi clinici e 10 asintomatici) dal gruppo A e 10 soggetti dal gruppo B. I tamponi sono stati processati in 3 pool di 10: Pool 1 (sintomatici gruppo A); Pool 2 (asintomatici gruppo A) e Pool 3 (asintomatici gruppo B).

Da ciascun animale sono stati raccolti contemporaneamente due tamponi destinati, rispettivamente, alla qRT-PCR ed all'isolamento virale. I tamponi destinati alla qRT-PCR sono stati fatti asciugare all'aria per 30 minuti dopo il prelievo, 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, che è stata eseguita all'arrivo in laboratorio.

qRT-PCR

Per evidenziare e tipizzare AMPV dai tamponi a secco, o confermare l'isolamento virale, è stata impiegata una qRT-PCR in grado di differenziare i sottotipi A e B (Cecchinato *et al.*, 2012). L'estrazione dell'RNA dai tamponi a secco e la retrotrascrizione sono state eseguite secondo il metodo descritto da Cavanagh *et al.* (1999). Per confermare l'isolamento virale, l'RNA è stato estratto dal terreno di coltura utilizzando un kit del commercio (QIAamp viral Mini Kit, Qiagen).

Isolamento virale.

Per l'isolamento virale di AMPV sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo, preparate a partire da embrioni di pollo SPF al 18-20° giorno di incubazione (Catelli *et al.*, 1998). Le colture sono state ritenute positive quando veniva osservata ciliostasi entro 10 giorni dalla inoculazione. La conferma dell'isolamento di AMPV è stata eseguita mediante qRT-PCR.

Sequenziamento ed analisi filogenetiche dei geni F e G.

Per ottenere le sequenze intere dei geni G ed F sono state eseguite, in maniera indipendente per ciascun gene, una RT e tre PCR overlapping come riportato da Cecchinato *et al.* (2010).

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. I campioni purificati sono stati inviati al Centro BMR Genomics di Padova dove sono stati sequenziati in entrambe le direzioni con il sequenziatore automatico 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate, utilizzando Clustal W, a tutte le sequenze complete dei geni G ed F di AMPV sottotipo B già pubblicate in Genbank. L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo neighbour-joining col software MEGA4. I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

RISULTATI

qRT-PCR ed isolamento

Mediante qRT-PCR, è stato evidenziato AMPV sottotipo B da tutti i pool esaminati. L'isolamento virale ha invece avuto successo solo dal pool di tamponi n.1; tale isolato è stato denominato aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12.

Analisi filogenetica dei geni F e G.

L'isolato AMPV sottotipo B aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12 è stato amplificato e sequenziato nei geni F e G. Le sequenze ottenute sono state analizzate e gli alberi filogenetici ottenuti sono riportati nelle figure 2 (gene F) e 3 (gene G). Il ceppo aMPV/B/IT/GuineaFowl/1818/12 forma un cluster unico con i ceppi AMPV sottotipo B isolati, sia da tacchino che da pollo, in Italia a partire dal 2001.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente lavoro riporta la prima segnalazione in Italia d'infezione da AMPV nella faraona. La sensibilità di questa specie era già stata riportata in Francia nel 1987 da Picault *et al.* e Kless *et al.*

Il ceppo virale isolato nel corso del focolaio appartiene al sottotipo B ed è strettamente correlato, dal punto di vista filogenetico, ai ceppi che hanno circolato in Italia, nel tacchino e nel pollo, a partire dal 2001 (Cecchinato *et al.*, 2010). Ciò indica la mancanza di peculiarità genetiche nel ceppo AMPV isolato dalla faraona.

Nel nostro Paese la maggior parte degli allevamenti di faraone è situata nel nord, in zone geografiche ad intensa vocazione avicola quali Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna, dove l'infezione da AMPV, in particolare da sottotipo B, è da considerarsi endemica (Catelli, 2006). Tale zona è caratterizzata da una presenza di allevamenti avicoli di più specie e categorie produttive, situati a distanze anche molto ravvicinate. Si ritiene che tale situazione epidemiologica di vicinanza con specie più sensibili ad AMPV della faraona (Gough *et al.*, 1988), e cicli produttivi non sovrapponibili, abbia condizionato l'insorgenza dell'infezione, mentre allo sviluppo della forma clinica abbia contribuito la riduzione del ricambio d'aria operata dall'allevatore per far fronte alle rigidità climatiche che hanno caratterizzato la stagione invernale 2012.

BIBLIOGRAFIA

Canon RM and RT Roe. (1982). Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians. *Australian Bureau of Animal Health*. Canberra, Australian Government Publishing Service, 17.

Catelli E. (2006). Dati epidemiologici sulle infezioni da pneumovirus aviare in Italia. Atti del Convegno: Malattie Virali Respiratorie e problemi di produzione, giornata studio INTERVET, Bologna, 7 giugno, 2006, 19-23.

Catelli E, Cook JKA, Chester J, Orbell SJ, Woods MA, Baxendale W and MB Huggins. (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, De Marco MA, Delogu M, Terregino C and V Guberti. (2001). Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Veterinary Record* 149: 56-58.

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

Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology* 146: 24-34.

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. Rauischholzhausen, Germany, 18-21 June 2012.

Gough R, 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 Record* 123: 58-59.

Kles V, Morin M, Picault JP, Drouin P, Guittet M and G Bennejean. (1987) Isolement d'un virus dans un cas de syndrome infectieux du gonflement de la tete avec coryza chez la pintade. *L'aviculteur* 483:112.

Picault JP, Giraud P, Drouin M, Guittet M, Bennejean G, Lamande J, Toquin D and C Gueguen. (1987). Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome. *Veterinary Record* 121: 135.

Stuart JC. (1989) Rinotracheitis: turkey rinotracheitis in Great Britain. In recent advances in turkey science. *Poultry Science Symposium* Series No. 21, Eds. C. Nixey 6 T.C. Grey, Butterworth, London, 217-224.

Toquin D., Bayon-Aboyer M.H., Eterradossi N., Morin H. and FL Jestin. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Veterinary Record*, 145: 680.

Figura 1. Faraona con infezione da Metapneumovirus Aviare: rigonfiamento dell'area periorbitale.



Figura 2. Albero filogenetico di ceppi di AMPV sottotipo B. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene F, utilizzando MEGA4. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.

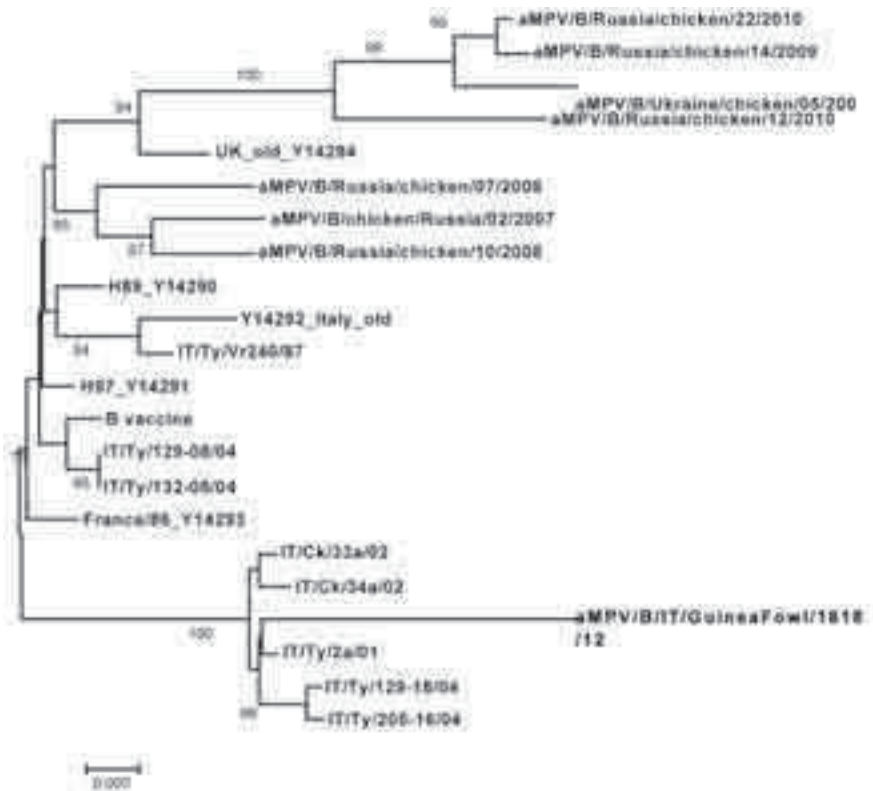


Figura 3. Albero filogenetico di ceppi di AMPV sottotipo B. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene G, utilizzando MEGA4. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.

