

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UN CEPPPO *MILD* DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK EVIDENZIATO IN POLLI RURALI CON FORMA NERVOSA

Mescolini G.¹, Lupini C.¹, Felice V.¹, Listorti V.¹, Laconi A.¹, Cecchinato M.², Catelli E.¹

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – ITALIA

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

Summary

Marek's disease is an important lymphoproliferative disease of chickens caused by Gallid herpesvirus 2, which is commonly referred to as Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1). This virus induces a range of pathological conditions including central and peripheral nervous system signs and, most frequently, visceral lymphomas.

There are very few data on the molecular characteristics and epidemiology of MDV-1 in Italy, both in commercial and in backyard chickens. For that reason feathers and organs were collected from Cochin chickens from a rural context affected by a Marek's disease classical nervous form. The MDV-1 strain detected by PCRs was sequenced and compared to a MDV-1 strain detected from broilers breeders affected by visceral lymphomas.

The number of PPPP motif repetitions found in the transactivation domain of the Meq protein, indicated that the virus detected in Cochin chickens was *mild* MDV-1, while the one detected in commercial poultry was *very virulent* or *very virulent plus* MDV-1. Clinical, macroscopic and microscopic findings supported the molecular results.

INTRODUZIONE

La malattia di Marek è un'importante malattia linfoproliferativa del pollo a diffusione mondiale causata da un *alphaherpesvirus* del genere *Mardivirus*, denominato *Gallid Herpesvirus 2* o, più comunemente, sierotipo 1 del virus della malattia di Marek (MDV-1). Questo virus è oncogeno e linfotropo, e può indurre varie forme patologiche fra cui le più comuni sono quelle neoplastica e nervosa. MDV-1 riconosce diversi patotipi virali denominati *mild*, *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus* (Schat e Nair, 2008).

La malattia è ancora oggi presente in Italia nonostante la vaccinazione sia applicata di routine su larga scala e recentemente sono stati descritti diversi focolai in allevamenti di riproduttori pesanti e di galline ovaiole (Piccirillo, 2011; Camarda e di Pineto, 2012). E' anche noto che la malattia è presente nell'allevamento rurale dove, di norma, non è attuata la vaccinazione.

Dati sulle caratteristiche molecolari dei ceppi virali circolanti in Italia, sia nel settore industriale sia in quello rurale, sono però attualmente assenti.

Nel presente lavoro sono stati caratterizzati due ceppi di MDV-1: il primo iso-

lato da polli rurali di razza ornamentale Cocincina affetti da malattia di Marek in forma nervosa, il secondo da riproduttori pesanti con forme neoplastiche viscerali. Nei polli rurali è stato anche eseguito esame clinico, necroscopico ed istopatologico. I virus sono stati evidenziati mediante diversi protocolli di PCR da penne e/o organi ed, al fine della caratterizzazione molecolare degli isolati, i prodotti di amplificazione del gene *meq* sono stati sequenziati e sottoposti ad analisi filogenetica.

MATERIALI E METODI

Animali e Campionamento

Due polli di razza Cocincina nana riccia, provenienti da un allevamento rurale multi-specie situato a Sarsina (FC) sono stati conferiti per diagnosi all'unità di Patologia Aviaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

I soggetti, nati in allevamento, al momento della comparsa della sintomatologia avevano circa due mesi. Su entrambi gli animali (accettati con numero 419/14 e 420/14) è stato eseguito l'esame clinico e, dopo soppressione, l'esame necroscopico. Dal soggetto 419/14 sono stati prelevati per PCR per MDV-1: fegato, polmone, rene, stomaco ghiandolare e penne. Da entrambi i soggetti sono stati prelevati per esame istopatologico: fegato, polmone, rene, stomaco ghiandolare, borsa di Fabrizio, plesso brachiale, plesso lombosacrale e nervo sciatico.

Il campione da allevamento intensivo di riproduttori pesanti (linea commerciale Ross 308), consisteva in un pool di penne prelevate da soggetti morti all'età di 23 settimane, che all'esame necroscopico mostravano linfomi epatici e splenici. Il pool di penne è stato sottoposto a PCR per MDV-1 con numero di accettazione 456/15.

Esame istopatologico

Porzioni degli organi (escluse le penne) sono state fissate in formalina tamponata al 10 %, quindi incluse in paraffina, sezionate al microtomo (5 micron) e colorate con Ematossilina ed Eosina. Le sezioni colorate sono state osservate al microscopio ottico (Nikon Leica, Nikon Corporation, Japan).

Estrazione del DNA e PCR

L'estrazione del DNA è stata eseguita da penne e da surnatante di omogenato di organi con il kit del commercio "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche) seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice, con opportune modifiche.

PCR sul Gene pp38

La PCR sul gene che codifica per la proteina fosforilata pp38, è stata eseguita

secondo il protocollo riportato da Dunn *et al.* (2010) (*primer forward* pp38F: 5'-GTG ATG GGA AGG CGA TAG AA-3'; *primer reverse* pp38R: 5'-TCC GCA TAT GTT CCT CCT TC-3'). Il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese di 225 pb è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, mediante colorazione con Bromuro di Etidio.

PCR sul Gene ULI

La PCR sul gene *ULI*, che codifica per la glicoproteina L, è stata eseguita secondo il protocollo riportato da Hassanin *et al.* (2013) (*primer forward* gL-F: 5'-ATG AAA ATT TAT AGA GTA CTC GTG-3'; *primer reverse* gL-R: 5'-GGC ATT GGC TCG TCG GCT-3'). Il prodotto di amplificazione delle dimensioni attese di 588 pb è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2%, mediante colorazione con Bromuro di Etidio.

PCR sul Gene meq

La PCR sul gene *meq* è stata eseguita secondo il protocollo riportato da Hassanin *et al.* (2013) (*primer forward* *meq*-F: 5'-ATG TCT CAG GAG CCA GAG CCG-3'; *primer reverse* *meq*-R: 5'-GGG TCT CCC GTC ACC TGG-3'). Questi oligonucleotidi amplificano una sequenza di 1020 pb, corrispondente all'intero gene *meq*; tuttavia nei diversi patotipi di MDV-1 sono presenti diverse isoforme del gene, a lunghezza variabile. Il prodotto di amplificazione è stato visualizzato, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al 1%, mediante colorazione con Bromuro di Etidio.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti di amplificazione del gene *meq* sono stati sequenziati, in entrambe le direzioni, presso il centro di sequenziamento MacroGen Europe (Amsterdam). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit, allineate e confrontate, utilizzando il software Clustal W, alle sequenze del gene *meq* di ceppi MDV-1 di riferimento (compresi i ceppi vaccinali) presenti in *GenBank* (tabella I). L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo Neighbor-Joining col software MEGA6. Sono stati considerati attendibili solo i nodi dell'albero filogenetico con valori di bootstrap (calcolati su 1000 replicati) pari o maggiori di 70.

Tabella I. Ceppi MDV-1 di riferimento depositati in *GenBank* inclusi nell'analisi di sequenza.

ISOLATO	PAESE D'O-RIGINE	PATOTIPO	N° ACCESSO DEL GENE <i>MEQ</i> (GenBank)
MPF57	Australia	vMDV	EF523774.1
04CRE	Australia	vMDV	EF523773.1
02LAR	Australia	vvMDV	EF523772.1
FT158	Australia	vvMDV	EF523771.1
CVI988/ Rispens(Intervet)	Olanda	attMDV	DQ534538.1
CU-2	USA	mMDV	AY362708.1
BC-1	USA	vMDV	AY362707.1
GA	USA	vMDV	M89471.1
GX060167	China	-	EU697887.1
JM102	USA	vMDV	HM488348.1
RB1B	USA	vvMDV	AY243332.1
RL	USA	vv+MDV	AY362720.1
TK	USA	vv+MDV	AY362721.1
N	USA	vv+MDV	AY362718.1
New	USA	vv+MDV	AY362719.1
U	USA	vv+MDV	AY362722.1
W	USA	vv+MDV	AY362723.1
X	USA	vv+MDV	AY362724.1
549	USA	vvMDV	AY362714.1
567	USA	vMDV	AY362709.1
571	USA	vMDV	AY362710.1
595	USA	vvMDV	AY362715.1
648A	USA	vv+MDV	AY362725.1
686	USA	vv+MDV	AY362727.1
3004	Russia	attMDV	EU032468.1
Lmeq	Cina	-	DQ453117.1
6_12	Polonia	-	KJ464837.1
56_12	Polonia	-	KJ464839.1
122_11	Polonia	-	KJ464835.1
121_11	Polonia	-	KJ464834.1
116_11	Polonia	-	KJ464833.1
108_11	Polonia	-	KJ464831.1

RISULTATI

Esame clinico ed anatomo-istopatologico

All'esame clinico i polli provenienti dall'allevamento rurale (419/14 e 420/14) mostravano difficoltà o incapacità di mantenere la stazione eretta, con atteggiamento a "spaccata", con dita chiuse a pugno o in decubito laterale con paralisi spastica agli arti (Figura 1). All'esame necroscopico era possibile osservare lesioni anatomopatologiche a carico dei plessi nervosi e dei nervi periferici (Figura 2), con interessamento dei plessi brachiale e lombosacrale, dei nervi brachiale, sciatico, intercostali e vago. I nervi avevano perso il normale aspetto bianco-lucente e presentavano un colorito giallastro. A un'osservazione attenta era evidente la perdita della tipica zigrinatura trasversale. In nessuna sede si evidenziavano lesioni a carattere neoplastico.



Figura1. Pollo rurale in decubito laterale con paralisi spastica degli arti (419/15)

Figura 2. Aumento di volume bilaterale del plessi e dei nervi brachiali, dei plessi lombo-sacrali e dei nervi sciatici (419/14).



Alterazioni istopatologiche erano presenti solo a carico dei nervi. L'aspetto istologico dei nervi si discostava dalla normalità (Figura 3). Si evidenziava presenza d'infiltrato di natura linfoide ed edema. Le lesioni erano classificabili nelle lesioni di tipo A e B, secondo quanto riportato da Payne e Biggs (1967). Le lesioni di tipo B o infiammatorie, erano caratterizzate da edema interneuritico ed infiltrato diffuso di piccoli, medi, grandi linfociti e plasmacellule (Figura 4); mentre quelle di tipo A o proliferative da infiltrato pleomorfo di piccoli, medi e grandi linfociti (Figura 5).

Figura 3. Pollo sano. Nervo sciatico. Aspetto istologico normale (40x).

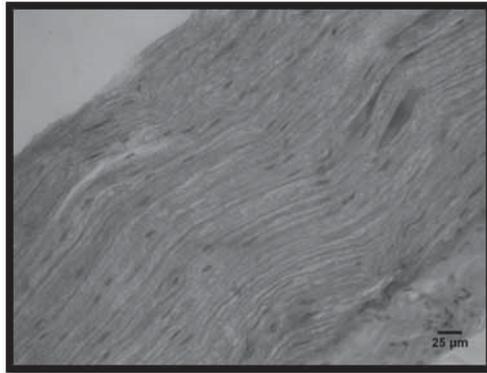


Figura 4. Pollo. Nervo sciatico. Edema inter-neuritico con infiltrazione diffusa di piccoli medi e grandi linfociti; sono visibili anche numerose plasmacellule. Lesione ascrivibile a “tipo B” (40x) (campione 420/14).

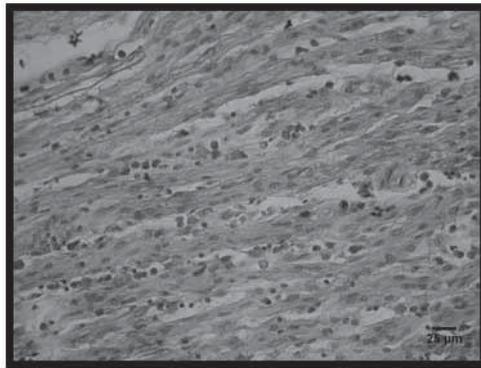
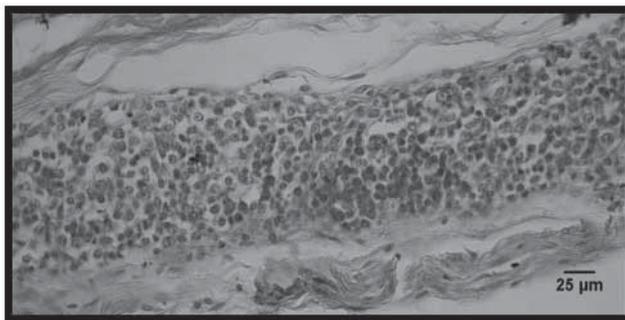


Figura 5. Pollo. Nervo sciatico. Infiltrato pleomorfo di piccoli, medi e grandi linfociti, compatibile con lesioni proliferative di “tipo A” (40x) (campione 420/14).



PCR

I campioni esaminati sono risultati tutti positivi ai diversi protocolli di PCR eseguiti, producendo bande di amplificazione delle dimensioni attese, con la sola peculiarità dei prodotti di PCR ottenuti da amplificazione del gene *meq* dei campioni da allevamento rurale. Questi prodotti sono risultati infatti di maggiore peso molecolare (rispetto all'isoforma di riferimento ed al campione da allevamento intensivo 456/15) (Figura 6). L'indagine è stata approfondita con il sequenziamento del campione 456/15 e di un amplificato del campione 419/14.

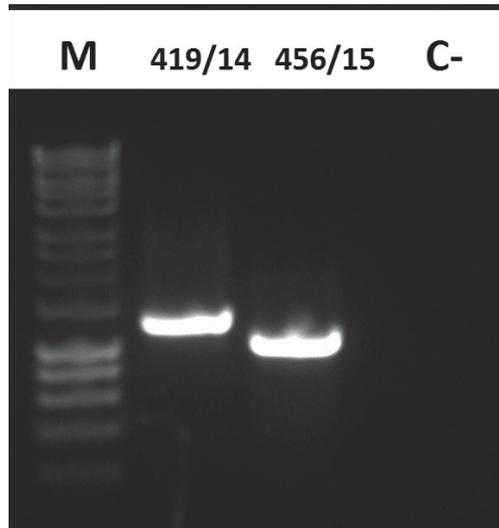


Figura 6. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di PCR su gene *meq* di campioni di penne. Linea 1: Marker Bioline (M). Linea 2: campione 419/14 da allevamento rurale banda di 1254 pb. Linea 3: campione 456/15 da allevamento commerciale banda di 1017bp. Linea 4: controllo negativo.

Sequenziamento ed analisi filogenetica

Dall'analisi di sequenze è stato evidenziato come il gene *meq* del ceppo virale 419/14 (1254 pb), in paragone con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens, presenti un'inserzione di 57 paia di basi (tra i nucleotidi 758 e 759) corrispondente a 19 aminoacidi e 9 mutazioni, di cui 8 codificanti.

Sempre in paragone con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens, il gene *meq* del ceppo 456/15 (1017 pb), presenta invece una delezione di 180 pb (da 579 a 759) corrispondente a 60 aminoacidi e 5 mutazioni, 4 delle quali codificanti.

Nella Tabella II sono state riportate le più alte percentuali d'identità fa il ceppo 419/14 e vari ceppi di riferimento. La più alta identità nucleotidica (94,4%) si riscontra con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens.

Tabella II. Percentuali d'identità nucleotidica (nt) ed aminoacidica (aa) del ceppo 419/14 in paragone con alcuni ceppi di riferimento.

	CVI988	CU-2	3008	GX060167	BC1	FTI58	JM102	L-MEQ	04-CRE	MPF57	02-LAR
419/14 (nt)	94,4%	94,1%	94%	94%	93,8%	93,8%	93,8%	93,8%	93,5%	93,6%	93,4%
419/14 (aa)	92,7%	92,4%	92,7%	92,7%	92,1%	91,4%	91,9%	92,1%	91,4%	91,6%	91,1%

Al calcolo delle percentuali d'identità nucleotidica ed amminoacidica del ceppo 456/15 con ceppi di riferimento, è risultata una identità del 100% con i ceppi di origine polacca (tabella I). Con gli altri ceppi le percentuali d'identità scendono a valori minori del 98,5%, con percentuali maggiori con i ceppi *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus*.

All'analisi di sequenza è stato possibile anche valutare il contenuto di prolina ed il numero di ripetizioni di 4 proline (PPPP) nel dominio ricco di proline della proteina Meq (Tabella III).

Il ceppo 419/14 ha presentato 9 ripetizioni PPPP e il 23,6 % di prolina; tali numeri sono in assoluto i maggiori riscontrati fra i ceppi esaminati. Il ceppo 456/15 invece ha presentato 4 ripetizioni PPPP, valore analogo a quello dei ceppi vMDV GA e 567.

Tabella III. Caratteristiche della proteina Meq nei ceppi 419/14 e 456/15 in paragone con ceppi di riferimento

ISOLATO	DIMENSIONE MEQ (aa)	DIMENSIONE INSERZIONE (aa)	% PROLINA	NUMERO DI PPPP	PATOTIPO
MPF57	398	59	22,9	5	vMDV
04CRE	398	59	22,2	5	vMDV
02LAR	398	59	22,2	5	vvMDV
FT158	398	59	22,9	5	vvMDV
CVI988/Rispens	399	60	23,3	8	attMDV
CU-2	398	59	23,1	7	mMDV
BC-1	398	59	23,1	7	vMDV
GA	339	-	21,5	4	vMDV
GX060167	398	59	23,1	6	ND
JM102	398	59	23,1	6	vMDV
RB1B	339	-	21,5	5	vvMDV
RL	339	-	20,6	2	vv+MDV
TK	339	-	20,6	2	vv+MDV
N	339	-	20,9	2	vv+MDV
New	339	-	20,7	2	vv+MDV
U	339	-	20,9	2	vv+MDV
W	339	-	21,2	4	vv+MDV
X	339	-	20,6	2	vv+MDV
549	339	-	20,6	2	vvMDV
567	339	-	21,2	4	vMDV
571	339	-	21,2	3	vMDV
595	339	-	20,6	2	vvMDV
648A	339	-	20,9	2	vv+MDV
686	339	-	20,9	2	vv+MDV
3004	398	59	23,1	6	attMDV
LMeq	398	59	23,1	7	ND
6_12	339	-	21,2	4	ND
56_12	339	-	21,2	4	ND
122_11	339	-	21,2	4	ND
121_11	339	-	21,2	4	ND
116_11	339	-	21,2	4	ND
108_11	339	-	21,2	4	ND
419/14	418	79	23,6	9	ND
456/15	339	-	21,2	4	ND

att=attenuato; m=mild; v=virulent; vv=very virulent; vv+= very virulent plus; ND= non determinato.

L'albero filogenetico generato sulle sequenze amminoacidiche della proteina Meq dei ceppi in esame, in Figura 7, mostra come, da un punto di vista filogenetico il ceppo 419/14 sia prossimo ai ceppi attenuati CVI988/Rispens e 3008 ed al ceppo *mild* CU-2, anche se non rientra in nessuno specifico cluster. Il ceppo 456/15 invece rientra nel cluster di ceppi isolati in Polonia.

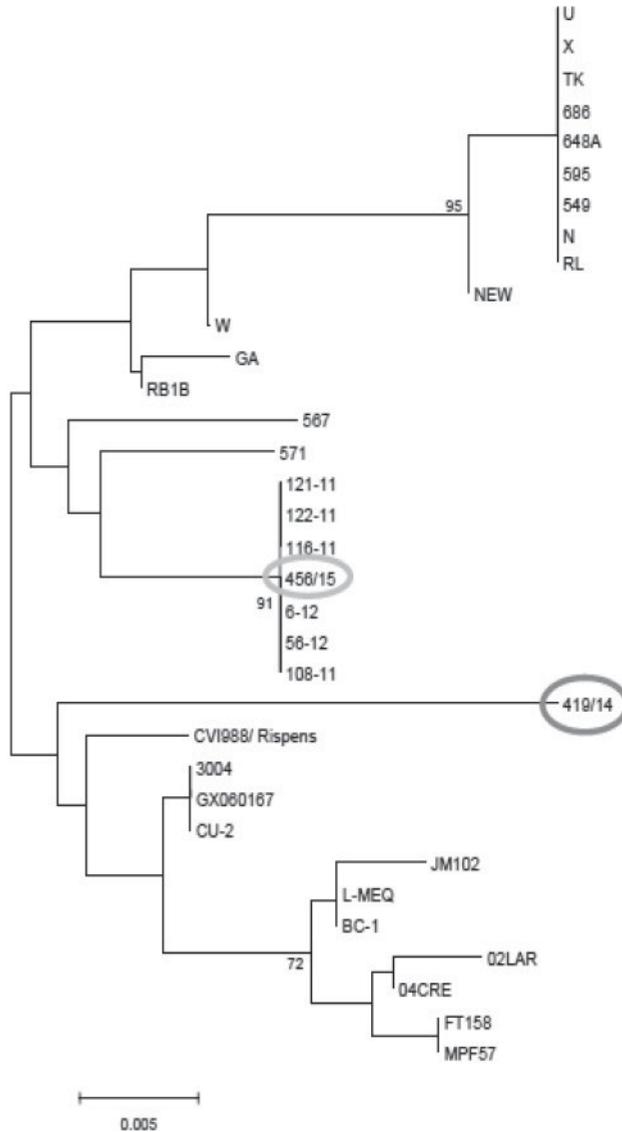


Figura 7. Albero filogenetico dei ceppi MDV-1 considerati, basato sulla sequenza aminoacidica della proteina Meq. Sono cerchiati in verde (419/14) e in giallo (456/15) i ceppi isolati nel presente lavoro.

DISCUSSIONE

Il ceppo 419/14 evidenziato nei polli rurali è classificabile, per le caratteristiche molecolari e per i riscontri clinici, necroscopici ed istologici come MDV-1 *mild*. La sintomatologia neurologica osservata nei soggetti colpiti è quella tipica della forma classica della malattia di Marek o “*fowl paralysis*” descritta nel 1907 da Marek. E’ riportato in letteratura che ceppi virali utilizzati come vaccini poco attenuati potrebbero causare forme nervose simili alla forma classica della malattia in animali di linea genetica sensibile (Bulow, 1977). Il riscontro, all’analisi di sequenza del ceppo 419/14, di una alta percentuale d’identità nucleotidica e aminoacidica con il ceppo vaccinale CVI988/Rispens non permette di escludere tale ipotesi.

Nel 2003 è stata descritta in Italia da Massi *et al.*, una “Sindrome Neurologica Periferica” (PNS) (Bacon *et al.*, 2001) in galline di linea leggera bianche. Questa forma patologica continua ad essere segnalata in Italia nelle pollastre di linea leggera (Massi, comunicazione personale). Essa viene spesso confusa con la forma nervosa della malattia di Marek poiché determina ingrossamento dei nervi periferici e paralisi spastica agli arti. La PNS si osserva a partire da 6 settimane di vita mentre la malattia di Marek generalmente non compare prima della età di 8-9 settimane (Calnek e Witter, 1997). Nella PNS, all’esame istologico dei nervi si osserva una neurite linfo-plasmacellulare, quindi un quadro prettamente infiammatorio, associato in alcuni casi a demielinizzazione. Tali lesioni sono uguali alle lesioni nervose di tipo B della malattia di Marek; in quest’ultima però si possono osservare nei nervi anche lesioni di tipo A, ed è comune il riscontro concomitante di linfomi agli organi viscerali, cosa che non avviene nella PNS. La PNS sembra essere il risultato di una risposta autoimmune del soggetto (Bacon e Witter, 1994) condizionata dall’aplotipo della regione genomica del complesso maggiore d’istocompatibilità (MHC) o locus B. Sembra infatti che l’aplotipo B 19 sia responsabile sia della sensibilità nei confronti della malattia di Marek che dell’insorgenza della PNS. La PNS è stata anche attribuita ad una reazione immunitaria al vaccino Rispens, quando somministrato a dosi 2/3 volte maggiori della dose consigliata; questa pratica è piuttosto frequente in campo (Massi, comunicazione personale). Nel nostro caso in entrambi gli animali è stato identificato MDV-1 sia da penne che da organi, ed a carico dei nervi sono state riscontrate non solo lesioni di tipo B ma anche di tipo A (tipiche della malattia di Marek).

È stato dimostrato in passato da diversi autori, come esista una correlazione tra la struttura del gene *meq* e l’oncogenicità dei ceppi virali (Lee *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2002; Shamblin *et al.*, 2004). In particolare è stato notato come a livello di regione del gene *meq* che codifica per un dominio di transattivazione della proteina Meq, ricco di ripetizioni di proline (*proline rich domain*), vi siano le basi molecolari della oncogenicità dei diversi ceppi virali. Shamblin *et al.* nel 2004 hanno notato che in alcuni ceppi a questi livelli si evidenziano delle inserzioni di nucleotidi *in-frame* con sequenze codificanti; in particolare i ceppi di MDV a bassa virulenza avrebbero un numero maggiore di ripetizioni dirette di sequenze

nucleotidiche in questa regione rispetto ai ceppi più virulenti. Il numero di queste sequenze ripetute varia tra i ceppi (Chang *et al.*, 2002) e la duplicazione di queste sequenze può avvenire sia per “*slippage*” della DNA polimerasi sia per meccanismi di ricombinazione, dando vita a diverse isoforme del gene *meq*, aventi diversa lunghezza, nei diversi ceppi virali. Le isoforme sono denominate: *meq* (1020bp), *L-meq* (large) (1200bp), *S-meq* (short) (897bp), *VS-meq* (very short) (744bp) (Chang *et al.*, 2002). La lunghezza del gene *meq* influenza la lunghezza della proteina Meq a causa dell’inserzione (o delezione) delle ripetizioni delle sequenze aminoacidiche nel dominio di transattivazione ricco di proline (Chang *et al.*, 2002). In questa zona della proteina sono localizzate delle ripetizioni di 4 proline (PPPP) il cui numero è maggiore nei ceppi virali a minor oncogenicità o non oncogenici mentre è minore nei ceppi altamente oncogeni. Un numero maggiore di ripetizioni PPPP determina una repressione dell’attività di transattivazione genica da parte della proteina che conduce ad una ridotta oncogenicità di quel ceppo virale (Chang *et al.*, 2002).

Il ceppo MDV-1 419/14 proveniente dall’allevamento rurale presentava nella proteina Meq il maggiore di ripetizioni PPPP in assoluto tra i ceppi analizzati. Esso presentava 9 ripetizioni PPPP in paragone con il ceppo CVI988/Rispens che ne presentava 8, ed i ceppi CU-2 e BC-1 che ne presentavano 7. In aggiunta, il contenuto percentuale di prolina, che rientra anch’esso fra i fattori di stima della patogenicità, ha il valore più alto osservato in assoluto (23,6%) per i ceppi esaminati. Questi dati evidenziano il basso potenziale oncogeno del ceppo MDV-1 dei polli rurali, confermato dalle osservazioni cliniche, necroscopiche ed istopatologiche.

Il ceppo MDV-1 456/15, isolato nei riproduttori, presentava invece 4 ripetizioni PPPP, così come riportato in tabella per ceppi *virulent* quali il GA e 567, anche se con un minor contenuto percentuale di prolina nella proteina Meq rispetto al ceppo GA. Dall’albero filogenetico si evince che da un punto di vista filogenetico il ceppo 419/14 è prossimo ai ceppi attenuati CVI988/Rispens e 3008 e *mild* (CU-2), anche se non rientra in nessun cluster. Il ceppo 456/15, invece, formava un cluster unico con ceppi isolati in Polonia.

CONCLUSIONI

Il ceppo 419/14 MDV-1 evidenziato durante questo studio in polli di allevamento rurale, è risultato essere un ceppo *mild* non solo su base molecolare, ma anche sintomatologica ed anatomico-istopatologica. In diagnosi differenziale è stata considerata la Sindrome Neurologica Periferica. Essa è stata esclusa con buona probabilità per le ragioni precedentemente discusse, quali principalmente la gravità delle lesioni ai nervi. Le caratteristiche molecolari del ceppo virale evidenziato, che lo rendono molto vicino a un ceppo vaccinale CVI988/Rispens del commercio, non permettono di escludere la possibilità che esso sia un ceppo tornato a virulenza dopo retropassaggi in allevamento su ospiti naturali, o sia un diverso ceppo MDV-1 vaccinale. In ambedue i casi, il virus potrebbe avere raggiunto l’al-

levamento rurale superando le barriere di biosicurezza applicate all'allevamento intensivo, venendo a contatto, con elevate cariche ambientali, con animali giovani di linee genetiche rurali particolarmente sensibili. Per confermare queste ipotesi lo studio andrebbe ampliato paragonando il ceppo 419/14 con altri ceppi vaccinali MDV-1 del commercio. Data la scarsità dei dati in letteratura sui ceppi di MDV circolanti in Italia, i risultati del presente lavoro portano un contributo originale.

BIBLIOGRAFIA

1. Bacon LD and RL Witter. (1994). Serotype specificity of B-haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines. *Avian Diseases* 38: 65-71.
2. Bacon LD, Witter RL and RF Silva. (2001). Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens. *Avian Pathology* 30: 487-499.
3. Bulow VV. (1977). Further characterisation of the CVI 988 strain of Marek's disease virus. *Avian Pathology* 6: 395-403.
4. Camarda A., Di Pineto L. (2013). Incontro "Stato sanitario dell'avicoltura Italiana: focus sulle principali malattie osservate durante il 2012" Stato sanitario della gallina ovaiole in Italia. LI Convegno annuale, Salsomaggiore Terme (PR), 11-12 ottobre 2012. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2013, LII convegno annuale. Forlì, 11-12 aprile 2013. Pp. 49-57.
5. Calnek BW and RL Witter. (1997). Marek's disease. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard GW, McDougald LR, Saif YM (Eds). *Diseases of Poultry* 10th edn, Iowa State University Press, Ames, IA pp. 369-413.
6. Chang KS, Lee SI, Ohashi K, Ibrahim A, and M Onuma. (2002). The detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 413-417.
7. Dunn JR., Witter RL, Silva RF, Lee LF, Finlay J, Marker BA, Kaneene JB, Fulton RM and SD Fitzgerald. (2010). The Effect of the Time Interval Between Exposures on the Susceptibility of Chickens to Superinfection with Marek's Disease Virus. *Avian Diseases* 54: 1038-1049.
8. Hassanin O, Abdallah F and IE El-Araby. (2013). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Marek's Disease Virus from Clinical Cases of Marek's Disease in Egypt. *Avian Diseases* 57: 555-561.
9. Lee, SI, Takagi M, Ohashi K, Sugimoto C and M Onuma. (2000). Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 287-292.

10. Payne LN and PM Biggs. (1967). Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 39: 281-302.
11. Piccirillo A. (2011). Malattia di Marek nei riproduttori pesanti: una malattia riemergente del settore avicolo? Atti della Società L Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 7-8 aprile 2011.
12. Schat KA and V Nair. (2008). Marek's disease. In: Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE (Eds). *Disease of Poultry* 12th ed. Iowa State University Press, Ames, IA, 452-514.
13. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL and MS Parcels. (2004). Comparative analysis of Marek's disease virus (MDV) glycoprotein-, lytic antigen pp38- and transformation antigen Meq-encoding genes: association of meq mutations with MDVs of high virulence. *Veterinary Microbiology* 102, 147-167.