

# SVILUPPO E APPLICAZIONE DI TEST DIAGNOSTICI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE E LA CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK CIRCOLANTI IN ITALIA

Fortin A.<sup>1</sup>, Cecchettin K.<sup>1</sup>, Drago A.<sup>1</sup>, Monne I.<sup>1</sup>, Piccirillo A.<sup>2</sup>, Davidson I.<sup>3</sup>, Terregino C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Legnaro (PD)*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Legnaro (PD)*

<sup>3</sup>*Kimron Veterinary Institute, Israele*

## Summary

Marek's disease (MD) is one of the most common lymphoproliferative diseases of chickens which causes mononuclear infiltration of different tissues and organs, such as peripheral nerves, gonad, viscera, muscle and skin. It is caused by an Alphaherpesvirus, called MDV or Gallid Herpesvirus 2 (GaHV-2). Although it has been studied in all its aspects from the early '60s and vaccines are now used all over the world, many issues remain unresolved due to the complexity of the disease. In order to activate specific surveys in the field, the IZSve has developed a series of molecular diagnostic methods for the MD. The development of these tests makes a rapid and robust diagnosis possible, allowing to distinguish the vaccine strains from those pathogens and to identify the pathotype in a short time. Samples from backyard farms, samples (environmental dust, feathers, spleens and livers) taken from an industrial flock of breeders in the first months of life, as well as samples from clinical cases of particular interest were analysed for validation of the methods. The data obtained so far confirm the high presence of Marek's disease in rural farms. The low number of outbreaks in industrial flocks lead us to believe that currently used chicken genetic lines and the vaccinations adopted are in most cases appropriate to counter the circulating viruses, which have mostly a medium-low pathogenic power. The detection of pathogenic viruses in the environment, even in farms with high standards of biosecurity which undergo intensive cleaning and disinfection cycles, highlights the importance of proper vaccination practices.

## INTRODUZIONE

La malattia di Marek (MD) è una malattia linfoproliferativa e nervosa del pollo domestico a diffusione mondiale causata da un *Alphaherpesvirus*, denominato MDV o Gallid Herpesvirus 2 (GaHV-2), strettamente cellulo-associato. Le lesioni causate da questo virus sono caratterizzate da un'infiltrazione di cellule mononucleate di tipo linfocitario nei nervi periferici e in altri tessuti e organi, compresa iride e cute.

La MD ha un impatto economico enorme sull'industria avicola in tutti i paesi del Mondo non solo per le differenti sindromi che provoca, alcune delle quali molto difficili da diagnosticare per assenza di sintomatologia manifesta, ma anche per i suoi effetti immunodepressivi che possono favorire infezioni secondarie causate da patogeni opportunisti o ridurre l'efficacia delle vaccinazioni per le diverse malattie.

Sebbene la MD sia stata ampiamente studiata in tutti i suoi aspetti dai primi anni '60 e sebbene i vaccini siano ormai utilizzati dappertutto, molte problematiche legate a questa malattia rimangono ancora irrisolte a causa della complessità della malattia stessa.

Al fine di attivare specifiche indagini conoscitive in campo, l'IZSV ha voluto sviluppare una serie di metodiche diagnostiche rapide per la MD. Allo stesso tempo, sono stati sviluppati anche test diagnostici rapidi per l'Anemia infettiva, un'altra malattia immunodepressiva del pollo per la quale è attualmente sconosciuta la situazione epidemiologica nel nostro Paese.

## MATERIALI E METODI

Per la validazione delle metodiche sono stati analizzati 168 campioni forniti dai laboratori diagnostici di Padova e Treviso, provenienti da allevamenti rurali identificati sospetti o positivi per la malattia di Marek a seguito di esame istologico. In seguito, sono stati analizzati diversi tipi di campioni (polvere ambientale, penne, milze e fegati) prelevati in un arco temporale di 16 settimane da un allevamento industriale di riproduttori in fase pollastra, per un totale di 108 campioni. Sono stati processati anche campioni provenienti da casi clinici di particolare interesse.

Le metodiche sviluppate sono state:

- Real-time PCR tipo Taqman per l'identificazione della malattia di Marek (MDV) adattato dal precedente lavoro di Davidson *et al.*, 2013;
- Real-time PCR tipo Taqman SYBR Green per discriminare i ceppi patogeni circolanti dai principali ceppi vaccinali (CVI988 e HTV) sviluppato *ex-novo*;
- PCR convenzionale con successivo sequenziamento per l'identificazione dei ceppi circolanti adattato dal lavoro di Mescolini *et al.*, (2015).
- Real-time PCR tipo Taqman per l'identificazione dell'anemia del pollo (CAV) adattato dal lavoro di Davidson *et al.*, 2013.

Le prime due metodiche utilizzano due set di *primer* e sonde descritti in letteratura (Davidson, *et al.*, 2013). Entrambe le metodiche hanno il medesimo ciclo termico, che prevede 3 minuti di attivazione della Taq polimerasi a 50°C, 95°C per 10 minuti di denaturazione iniziale e 40 cicli composti da una denaturazione di 95°C per 15 secondi e da uno *step* di *annealing* a 55°C per un minuto.

La metodica SYBR Green utilizza i seguenti *primer*: VPP22-F AGTCCAAATCTGAACGTACA e VPP22-R CGATTTGATTTCAATTCAC che sono stati sviluppati *in house* allineando diverse sequenze del gene VP22 presenti in banca dati, utilizzando il programma MEGA 5 per identificare una regione che presenta un *gap* nelle sequenze vaccinali rispetto ai ceppi *wild type*.

La reazione utilizza il kit di amplificazione QuantiTect SYBR® Green RT-PCR (Qiagen) col seguente ciclo termico: 50°C a 3 minuti per l'attivazione dell'enzima e 10 minuti a 95°C seguiti da 35 cicli composti da due *step*, il primo di denaturazione a 95°C per 15 secondi e il secondo di *annealing* a 55°C per 30 secondi. La curva di *melting* è stata effettuata da 65°C a 85°C con una *ramp* di 0,5°C. Per verificare la specificità del metodo sono stati testati i due vaccini più usati (CVI988 e il ceppo HVT); una differente temperatura di *melting* rende possibile la differenziazione dei vaccini più comuni dalle varianti *wild-type*.

Per la discriminazione dei ceppi circolanti è stata adottata una PCR convenzionale con *target* il gene Meq (Mescolini *et al.*, 2015) e successivo sequenziamento. L'amplificazione del materiale genetico è stata effettuata utilizzando i primer: MEQ-143F TTCCCTGACGGCCTATCTGA, MEQ-1008R AAGCTGAGCGTAAACCGTCC mediante il Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen). Il profilo termico contempla un'attivazione della DNA polimerasi a 95°C per 5 minuti, seguito da 40 cicli composti da una denaturazione a 95°C per 30 secondi, un'*annealing* a 65° C per 1 minuto e un'estensione a 72°C per 30 secondi, seguiti da un'estensione finale di 5 minuti a 72°C.

## RISULTATI

### *Allevamenti rurali*

I risultati delle due metodiche MDV e CAV effettuate su campioni provenienti da polli rurali sono riportati in tabella 1.

**Tabella 1:** risultati forniti dalle due metodiche rPCR di tipo Taqman su campioni di volatili rurali suddivisi per matrice

Organi esaminati	N° campioni identificati come sospetti o positivi alla malattia di Marek da esame istologico	N° positivi alla Real time PCR per virus della malattia di Marek	N° positivi alla rPCR per virus dell'anemia infettiva (CAV)
Fegato	43	31	23
Milza	32	23	19
Piume	34	24	17
Stomaco	32	20	24
Nervo sciatico	11	5	7
Rene	6	3	4
Ovidotto	3	1	0
Cuore	1	1	0
Intestino	1	1	1
Polmone	1	1	0
Timo	1	0	1
Sangue	3	2	-
TOTALE	168	112	96

I 112 campioni risultati positivi a MDV sono stati successivamente analizzati con la metodica SYBR green per l'individuazione dei ceppi vaccinali: 109 sono stati identificati come virulenti e 3 come ceppi vaccinali. I tre virus vaccinali sono stati individuati in episodi di "Paralisi transitoria".

*Monitoraggio ambientale in allevamento industriale*

In tabella 2 sono riportati i risultati delle rPCR per la Malattia di Marek divisi per matrici.

**Tabella 2:** risultati forniti dalle due metodiche rPCR di tipo Taqman e SYBRgreen per l'identificazione dei ceppi di MD da campioni di allevamento industriale suddivisi per matrice

	<b>Totale</b>	<b>Positivi MDV</b>	<b>Ceppi patogeni</b>	<b>Ceppi vaccinali</b>
Fegato	11	1	0	1
Milza	22	10	0	10
Penne	30	23	0	23
Polvere	20	15	0	15
Tamponi di polvere	25	19	12	7

Tutti i 108 campioni sono stati esaminati anche tramite real-time PCR per l'identificazione del virus dell'anemia infettiva e sono risultati tutti negativi.

Grazie al campionamento regolare dello stesso allevamento è stato possibile monitorare la presenza/circolazione del virus della malattia di Marek nell'arco di 16 settimane sia negli animali, tramite raccolta di organi e di penne da esemplari morti, sia nell'ambiente tramite raccolta di polvere presente in allevamento. I risultati sono riportati in tabella 3.

**Tabella 3:** Andamento della presenza di virus della malattia di Marek nell'arco delle 16 settimane di osservazione in un allevamento industriale

		<b>MDV/ totale</b>	<b>vaccinali/positivi</b>	<b>patogeni/positivi</b>
1 settimana	Fegato	0/3	0	0
	Penne	0/3	0	0
	Polvere	0/3	0	0
	Milza	10/12	10/10	0
2 settimana	Fegato	1/3	1/1	0
	Penne	2/3	2/2	0
	Polvere	0/3	0	0
	Milza	0/10	0	0
4 settimana	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	3/3	0/3	3/3
5 settimana	Fegato	0/3	0	0
	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	3/3	0	3/3
6 settimana	Fegato	0/2	0	0
	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	6/6	0	6/6
8 settimana	Polvere	3/3	3/3	0
9 settimana	Penne	3/3	3/3	0
10 settimana	Polvere	4/4	4/4	0
12 settimana	Polvere	3/3	3/3	0
13 settimana	Penne	3/3	3/3	0
	Polvere	2/3	2/2	0
14 settimana	Penne	5/6	5/5	0
	Polvere	2/5	2/2	0
16 settimana	Penne	1/3	1/1	0
	Polvere	1/2	1/1	0

#### *Focolaio in riproduttori pesanti*

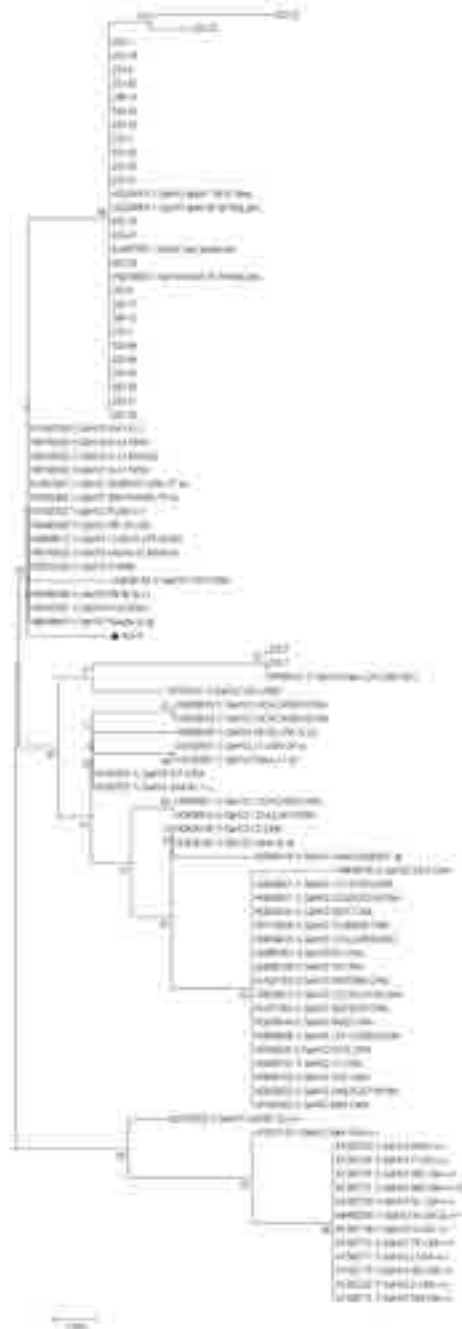
Ad aprile 2016 sono stati conferiti presso il laboratorio di Virologia Speciale dell'IZS Ve dei campioni di riproduttori pesanti in fase di deposizione, in cui era stato evidenziato incremento di mortalità e voluminose masse neoplastiche, prevalentemente a livello renale e intestinale, in soggetti sottoposti all'esame necroscopico. I campioni sono risultati positivi per MDV ceppo patogeno.

#### *Caratterizzazione dei ceppi circolanti*

Su alcuni campioni identificati come virulenti alla Real-Time PCR è stata effettuata l'ulteriore PCR convenzionale e sequenziamento che ha come *target* molecolare il gene *meq*.

A seguito della traduzione in aminoacidi della sequenza ottenuta è stato possibile creare un albero filogenetico (Fig.1).

**Figura 1:** Albero filogenetico generato con sequenze amminoacidiche.



▲ Sequenza di un virus identificato come vaccinale in PCR Real-Time

I virus individuati appartengono a genogruppi differenti. All'analisi filogenetica, la maggior parte dei ceppi (indicati nell'albero come 222-, 223-, 399-12) presenta un'omologia del 99% con ceppi isolati in Polonia (AC: KJ464785.1), mentre due (222-7 e 222-8) risultano omologhi al 99% con un ceppo individuato in India (AC: KF895031.1). Nonostante questa popolazione eterogenea, tutti i virus identificati condividono un *pattern* di virulenza basso, ad eccezione del virus (399-12) identificato nel corso del focolaio in riproduttori pesanti plurivaccinati. Dal *pattern* amminoacidico di virulenza (AEDQVCPPTP) questo ceppo è risultato avere caratteristiche simili ai ceppi *virulent* o *very-virulent* (Shamblin *et al.*, 2004).

## DISCUSSIONE

Lo sviluppo di questi test molecolari per la malattia di Marek rende possibile una diagnosi rapida e robusta per questa malattia, consentendo in breve tempo di distinguere i ceppi vaccinali da quelli patogeni circolanti e di individuarne il patotipo. Dalle prime analisi effettuate si conferma l'elevata presenza di virus della malattia di Marek negli allevamenti rurali.

Interessante anche il dato dell'elevata prevalenza del virus dell'anemia infettiva in questo tipo di allevamenti.

Le esigue segnalazioni di casi conclamati negli allevamenti industriali ci portano a pensare che attualmente le linee genetiche utilizzate e le vaccinazioni condotte siano idonee a contrastare nella maggior parte dei casi i virus circolanti, dotati per lo più di un potere patogeno medio-basso.

I metodi qui presentati si sono dimostrati adatti inoltre per l'analisi del virus in ambiente, cosa molto importante data l'elevata resistenza del virus all'esterno dell'ospite. Il riscontro di virus patogeni nell'ambiente, anche in allevamenti con alti standard di biosicurezza e sottoposti a intensi cicli di pulizia e disinfezione, sottolinea l'importanza di una corretta prassi di vaccinazione.

## BIBLIOGRAFIA

- Shamblin Christine E., Greene Natalie, Arumugaswami Vaithilingaraja, Dienglewicz Robert L., Parcels Mark S. (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.
- Davidson, I., Reibshstein I. and A. AlTour (2013). Quantitation of Marek's disease and chicken anemia viruses in organs of experimentally-infected and of commercial chickens by multiplex real-time PCR. *Avian Diseases*, 57(2), Suppl. 2013, 532-538.
- Mescolini G., Lupini C., Felice V., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Catelli E. (2015). Caratterizzazione molecolare di un ceppo MILD del virus della malattia di Marek evidenziato in polli rurali con forma nervosa. Atti della Società Italiana di Patologia Aviare LIV Convegno Annuale Forlì, 16-17 Aprile 2015.