

EPIDEMIOLOGIA DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA

Tucciarone C. M.¹, Franzo G.¹, Lupini C.², Torres Alejo C.³, Listorti V.², Mescolini G.², Brandão P. E.³, Martini M.¹, Catelli E.², Cecchinato M.¹

¹Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, viale dell'Università 16, Legnaro 35020, PD, Italia;

²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia 40064, BO, Italia;

³Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, 05508-270, São Paulo, SP, Brasile.

Abstract

The poultry production sector is tightly centred in Northern Italy, where chickens, turkey and other minor species are reared closely. Among the several well-known and managed respiratory issues, *avian Metapneumovirus* (aMPV) is growing as a concern also in chicken production, especially in broiler farming. Consistent data on its prevalence are lacking, so aMPV detections were summarized from longitudinal studies and diagnostic one-off samplings from Northern Italy from 2014 to 2016. The results demonstrated the wide circulation of aMPV subtype B and its presence in subsequent cycles in the same farm. aMPV sequences from chickens and turkeys showed high homology from the comparison, excluding a host-based strain separation. A field vaccination trial was also performed in two aMPV positive farms to verify the benefits of a subtype B-based vaccine administration in broilers, which appeared to fully control the clinical signs even if the persistence of a field strain was revealed in one of the farms.

INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus aviare* (aMPV) è l'agente eziologico della Rinotracheite del tacchino, caratterizzata da congiuntivite, scolo nasale, rantoli, starnuti e morbilità molto elevata nel tacchino da carne, mentre in riproduttori e ovaiole l'infezione è correlata ad un calo dell'ovodeposizione e ad alterazioni della qualità delle uova (Cook, 2000). Nel pollo, la Sindrome della testa gonfia (SHS) è considerata la conseguenza dell'interazione di aMPV e altri patogeni, principalmente *Escherichia coli*, manifestandosi con abbattimento, sintomatologia respiratoria, edema periorbitale che può estendersi a tutta la testa (Hafez, 1993). Il tradizionale ruolo di semplice agente predisponente o di cofattore (Cook, 2000) nelle problematiche respiratorie del broiler, è però messo in discussione dai numerosi episodi di sintomatologia attribuita unicamente ad aMPV. Sono infatti sempre maggiori le indicazioni di un possibile adattamento di aMPV all'ospite pollo o di una più marcata sensibilità di questi animali, date le numerose segnalazioni di manifesta sintomatologia clinica da infezione da aMPV sia in campo (Tucciarone et al., 2016) sia riprodotta in condizioni sperimentali (Moronato et al., 2016).

Altro interessante aspetto da considerare nell'esame della problematica sostenuta da aMPV nel pollo, è l'interazione con il *virus della Bronchite Infettiva* (IBV). A quest'ultimo è stata imputata un'azione competitiva da parte dei ceppi vaccinali e di

campo (Cavanagh et al., 1999, Cook et al., 2001) nei confronti dell'ingresso di aMPV e/o dalla protezione promossa dal vaccino. Episodi di coinfezione sono però stati documentati, soprattutto nella seconda metà del ciclo produttivo, sia in presenza di ceppi di IBV vaccinali sia di campo (Tucciarone et al., 2016).

In Europa risultano sempre più frequenti i report di aMPV nel pollo (Cecchinato et al., 2016, Franzo et al., 2017), in associazione o meno a sintomatologia, e anche in Italia non sono nuove le segnalazioni di aMPV in broiler, ovaiole e riproduttori (Cecchinato et al., 2013a, Cecchinato et al., 2012, Tucciarone et al., 2016), ma mancano dati organici sulla sua prevalenza e distribuzione nel nostro Paese.

Questo lavoro vuole fornire un quadro più chiaro dell'epidemiologia di aMPV nel broiler, attraverso studi longitudinali e attività diagnostica nel Nord Italia. Per verificare l'efficacia di strategie di controllo nei confronti di aMPV anche nel broiler, aggiuntive alle consuete misure di biosicurezza, si descrive inoltre una prova di vaccinazione, attuata in condizioni di campo in aziende in precedenza colpite da aMPV.

MATERIALI E METODI

Studi longitudinali e campioni diagnostici

Nel periodo dal 2014 al 2016 sono stati effettuati, nell'ambito di studi longitudinali e monitoraggi diagnostici, 313 campioni da 46 aziende distribuite nel Nord Italia. Ciascuno di questi era costituito da un pool di 10 tamponi orofaringei/tracheali per capannone. Per ogni campione sono state registrate le informazioni anamnestiche cliniche, l'età dei broiler, i protocolli di vaccinazione in atto per la Bronchite Infettiva, la data di campionamento, l'azienda e la localizzazione geografica. In nessuna delle aziende coinvolte nello studio erano previsti piani di vaccinazione contro aMPV.

Diagnostica molecolare per aMPV e IBV e analisi filogenetica

I campioni sono stati sottoposti ad estrazione dell'RNA virale con un kit commerciale (High Pure RNA Isolation Kit, Roche®, Mannheim, Germania). La presenza di aMPV è stata valutata mediante una multiplex Real Time RT-PCR (Cecchinato et al., 2013b), in grado di identificare e distinguere simultaneamente il sottotipo A e B. I campioni sono stati testati inoltre per IBV, mediante una RT-PCR generica (Cavanagh et al., 1999) e sequenziamento Sanger nella regione ipervariabile del gene S1 presso l'azienda Macrogen Europe (Amsterdam, Paesi Bassi). È stata effettuata la genotipizzazione dei ceppi identificati per differenziarne l'effettiva origine di campo o vaccinale (Franzo et al., 2014). In base alla vicinanza con aziende di tacchini e alla positività ad aMPV in cicli precedenti, sono stati selezionati tre campioni positivi (ID 92, 95, 104, del 2014) (Tabella 1) che, assieme a due campioni provenienti da aziende circostanti di tacchini, sono stati parzialmente (436 bp) amplificati e sequenziati nel gene G utilizzando il metodo descritto da Cecchinato et al. (2010). Le sequenze consenso ottenute sono state allineate a sequenze depositate di aMPV italiane ed europee e analizzate con il metodo Neighbor joining.

Valutazione dell'efficacia vaccinale in campo

Nel 2015 è stata predisposta una prova sperimentale di vaccinazione contro aMPV in due aziende di broiler che avevano segnalato in precedenza problematiche legate

a questo patogeno. Gli animali sono stati vaccinati a 12 giorni di vita con un vaccino basato su aMPV sottotipo B (ceppo VCO3) e monitorati settimanalmente tramite la raccolta di tamponi orofaringei, processati come descritto in precedenza. I campioni sono stati sottoposti a nested RT-PCR (Naylor et al., 1997) per la tipizzazione e sequenziati presso l'azienda Macrogen Europe (Amsterdam, Paesi Bassi). L'analisi filogenetica con metodo Neighbor joining è stata effettuata per distinguere l'origine di campo o vaccinale dei ceppi di aMPV amplificati.

RISULTATI

Ottanta (25,6%) campioni sono risultati positivi per aMPV, tutti appartenenti al sottotipo B e provenienti da 27 aziende (58,7%). In alcune di esse (3, 17 e 39) (Tabella 1), la presenza di aMPV è stata identificata per più cicli consecutivi. Nel 95% delle positività, gli animali possedevano un'età superiore ai 26 giorni (Figura 1) e nel 68,8% dei casi era presente sintomatologia respiratoria. I sintomi clinici erano associati per il 37,6% al solo riscontro di aMPV e per il 10,2% a IBV di campo. Tutti i campioni sono risultati positivi per IBV, il 91,7% ha rivelato la presenza di uno dei ceppi vaccinali utilizzati in azienda, mentre in 24 (7,7%) campioni è stato identificato il ceppo QX e in 2 (0,6%) il ceppo Q1. Solo nel 3,5% dei casi è stata accertata la compresenza di aMPV e IBV. Le analisi filogenetiche dei ceppi selezionati di aMPV e la comparazione con i ceppi provenienti da allevamenti di tacchino hanno dimostrato la perfetta identità tra le sequenze ottenute in questo studio e la divergenza rispetto ad altre sequenze italiane (Figura 2).

Durante la prova di vaccinazione in campo non è stata osservata sintomatologia clinica, anche in presenza di ceppi di campo identificati in tre dei quattro capannoni dell'azienda 1. Nell'azienda 2 è stato possibile sequenziare al 25° giorno post-vaccinazione (36 giorni di età) un solo ceppo, riconducibile al vaccino utilizzato (Tabella 2).

DISCUSSIONE

Questo studio ha permesso di aggiornare alcuni aspetti dell'epidemiologia italiana di aMPV nel broiler. aMPV sottotipo B si conferma un patogeno molto diffuso anche in questa specie, sempre più frequentemente associato alla presenza di sintomi respiratori. Nel Nord Italia, l'elevata vocazione avicola del territorio rende inevitabile la prossimità di allevamenti di specie diverse, quali broiler o tacchini. È quindi plausibile che aMPV diffonda da un settore all'altro, senza che la direzionalità del flusso sia nota. Dal punto di vista filogenetico infatti, la vicinanza delle sequenze provenienti dai due ospiti mette in luce un'evoluzione progressiva nel tempo, in assenza di *cluster* ospite-specifici. La presenza virale evidenziata in cicli consecutivi nella stessa azienda, denota la capacità del pollo da carne di assicurare condizioni di persistenza e diffusione del patogeno. La comparsa di aMPV dalla seconda metà del ciclo produttivo suggerisce infatti una precisa finestra temporale di maggiore sensibilità degli animali, probabilmente influenzata anche dalle condizioni di allevamento. Una maggiore sensibilità dell'ospite verso aMPV, potrebbe essere anche dimostrata dalla sua sempre più frequente identificazione assieme a IBV, sia di origine vaccinale sia di campo e per lungo tempo ritenuto elemento di ostacolo alla sua replicazione. Altresì, l'efficace controllo della BI tramite la vaccinazione potrebbe invece aver garantito un più ampio margine d'azione ad aMPV. Il suo ruolo epidemiologico nel pollo non risulta quindi trascurabile e sottolinea l'importanza di valutare, in aree "problema" a

causa dell'elevata pressione infettante, la possibile adozione di strategie di controllo. A tal proposito, la prova di vaccinazione in campo in aziende già colpite da aMPV, ha permesso la riduzione della presenza virale in una delle due aziende monitorate, mostrando la persistenza vaccinale del ceppo utilizzato nella stessa. Nell'altra azienda, pur in presenza di ceppi di campo, si è invece potuta verificare una chiara efficacia nella riduzione della sintomatologia clinica, indispensabile nel primo approccio di contenimento del problema e, di conseguenza, dell'impatto economico. Questo studio affronta quindi aspetti preliminari legati alla diffusione di aMPV nel settore dell'allevamento del broiler, la sua epidemiologia e circolazione nel Nord Italia e il potenziale delle opzioni di profilassi indiretta da estendere anche al pollo da carne, stimolando l'attenzione verso una problematica spesso sottovalutata.

BIBLIOGRAFIA

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

Cecchinato, M., Drigo, M., Lupini, C., Martini, M., Listorti, V., Franzo, G., Bonci, M., Laconi, A., Morandini, E., Catelli, E., 2013a. Field survey of avian metapneumovirus in Northern Italy. *Large Animal Review* 19, 267-270.

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

Cecchinato, M., Ferreira, H.L., Munir, M., Catelli, E., 2016. 10 Avian Metapneumovirus. *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Molecular Epidemiology and Control* 127.

Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O.S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M., Catelli, E., 2013b. Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathology* 42, 283-289.

Cecchinato, M., Lupini, C., Ricchizzi, E., Falchieri, M., Meini, A., Jones, R.C., Catelli, E., 2012. Italian field survey reveals a high diffusion of avian metapneumovirus subtype B in layers and weaknesses in the vaccination strategy applied. *Avian Diseases* 56, 720-724.

Cook, J., 2000. Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal* 160, 118-125.

Cook, J.K., Huggins, M.B., Orbell, S.J., Mawditt, K., Cavanagh, D., 2001. Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathology* 30, 233-242.

Franzo, G., Naylor, C.J., Lupini, C., Drigo, M., Catelli, E., Listorti, V., Pesente, P., Giovanardi, D., Morandini, E., Cecchinato, M., 2014. Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine* 32, 6765-6767.

Franzo, G., Tucciarone, C.M., Enache, M., Patru, V., Ramon, G., Koutoulis, K.C., Cecchinato, M., 2017. First report of *avian Metapneumovirus* subtype B field strain in a Romanian broiler flock during an outbreak of respiratory disease. *Avian Diseases* (in press).

Hafez, H., 1993. The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review. *Arch.Geflugelkunde* 57, 181-185.

Moronato, M.L., Gobbo, F., Mainenti, M., Franzo, G., Cecchinato, M., Catelli, E., Catania, S., Martini, M., 2016. Infezione sperimentale con *Metapneumovirus aviare* e *Mycoplasma synoviae* in polli da carne: risultati preliminari. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria*, 218-221.

Naylor, C., Shaw, K., Britton, P., Cavanagh, D., 1997. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology* 26, 327-338.

Tucciarone, C.M., Franzo, G., Berto, G., Drigo, M., Cecchinato, M., 2016. Cinetica di ceppi vaccinali del virus della Bronchite Infettiva e interazioni con ceppi di campo e *Metapneumovirus aviare* in allevamenti di broiler. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria*, 252-260.

Azienda	Ciclo	Capannone	Età	Data	Caratterizzazione ceppo IBV	aMPV	Segni clinici	ID
1	-	1	39	18/06/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	320
3	1	1	13	16/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	16
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	17
		1	20	23/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	33
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	34
		1	27	30/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	35
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	36
	2	2	34	16/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	104
	3	1	38	08/01/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	165
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	166
	4	-	1	36	04/11/2015	Ceppo vaccinale	+	✓
2			Ceppo vaccinale			+	✓	377
8	-	1	47	19/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	362
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	366
		3			Q1	+	✓	370
10	-	2	35	03/03/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	509
		3			QX	+	✓	510
11	-	2	39	29/03/2016	QX	+	✓	535
12	-	5	45	31/08/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	336
		6			Ceppo vaccinale	+	✓	337
		7			Ceppo vaccinale	+	✓	341
13	-	5	32	29/09/2015	Ceppo vaccinale	+	✗	342
15	1	1	36	16/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	106
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	107
		2	44	24/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	108
		3			Ceppo vaccinale	+	✗	109

17	1	3	26	21/07/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	31
		3	40	04/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	38
		3	49	13/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	43
		2	50		Ceppo vaccinale	+	✗	44
	2	3	45	24/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	92
		4			Ceppo vaccinale	+	✗	93
	4	3	36	11/03/2015	Ceppo vaccinale	+	✗	223
-	3	54	01/04/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	247	
18	-	1	50	06/07/2015	QX	+	✓	330
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	331
19	-	1	49	12/01/2016	QX	+	✓	444
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	445
21	-	2	38	29/01/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	478
24	-	1	38	13/05/2016	QX	+	✓	611
		3			Ceppo vaccinale	+	✓	612
26	-	2	42	23/02/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	500
27	-	n.r.	42	19/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	372
29	-	n.r.	40	19/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	398
30	1	1	30	16/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	83
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	85
		1	38	24/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	86
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	87
		3			Ceppo vaccinale	+	✗	90
		1			45	31/10/2014	Ceppo vaccinale	+
32	-	2	41	07/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	359
		5			Ceppo vaccinale	+	✓	360
33	-	n.r.	36	24/02/2016	QX	+	✓	504
34	-	1	44	30/01/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	185
35	-	1	43	20/04/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	556
		2			QX	+	✓	557
		3			QX	+	✓	558

36	1	1	34	08/04/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	248
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	249
		3			Ceppo vaccinale	+	✓	250
		4			Ceppo vaccinale	+	✓	251
37	-	1	47	17/03/2016	QX	+	✓	541
39	1	1	42	08/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✓	40
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	41
		1	47	13/08/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	45
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	46
	2	2	45	27/10/2014	Ceppo vaccinale	+	✗	95
	4	1	37	11/03/2015	Ceppo vaccinale	+	✗	220
		2			Ceppo vaccinale	+	✗	221
	5	1	34	14/05/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	255
		2			Ceppo vaccinale	+	✓	256
	44	1	2	32	20/10/2015	Ceppo vaccinale	+	✓
3			Ceppo vaccinale			+	✓	396
4			Ceppo vaccinale			+	✓	397
2		4	49	01/12/2015	QX	+	✓	405
-		2	50	23/03/2016	Ceppo vaccinale	+	✓	530
		3			Ceppo vaccinale	+	✓	531
		4			Ceppo vaccinale	+	✓	532
46	1	2	43	01/02/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	192
	5	3	44	04/11/2015	Ceppo vaccinale	+	✓	380

Tabella 1: Campioni aMPV positivi provenienti dagli studi longitudinali e dai monitoraggi diagnostici e informazioni anamnestiche e cliniche ad essi associate.

Azienda/ Capannone	Punto di campionamento	Età (gg)	Giorni post vaccinazione	Nested RT- PCR aMPV	Sequenziamento
Azienda 1/ Capannone 1	1	22	11	Negativo	n.p.
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
	4	43	32	aMPV/B	non tipizzato
Azienda 1/ Capannone 2	1	22	11	Negativo	n.p.
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
	4	43	32	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
Azienda 1/ Capannone 3	1	15	4	Negativo	n.p.
	2	22	11	aMPV/B	Ceppo di campo/ cluster 1
	3	29	18	aMPV/B	non tipizzato
	4	36	25	aMPV/B	non tipizzato
Azienda 1/ Capannone 4	1	15	4	aMPV/B	non tipizzato
	2	22	11	Negativo	n.p.
	3	29	18	Negativo	n.p.
	4	36	25	Negativo	n.p.
Azienda 2/ Capannone 1	1	22	11	Negativo	n.p.
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	Negativo	n.p.
	4	43	32	Negativo	n.p.
Azienda 2/ Capannone 2	1	22	11	aMPV/B	non tipizzato
	2	29	18	Negativo	n.p.
	3	36	25	aMPV/B	Ceppo vaccinale
	4	43	32	Negativo	n.p.

Tabella 2: Schema di campionamento e risultati della prova di vaccinazione nei confronti di aMPV.

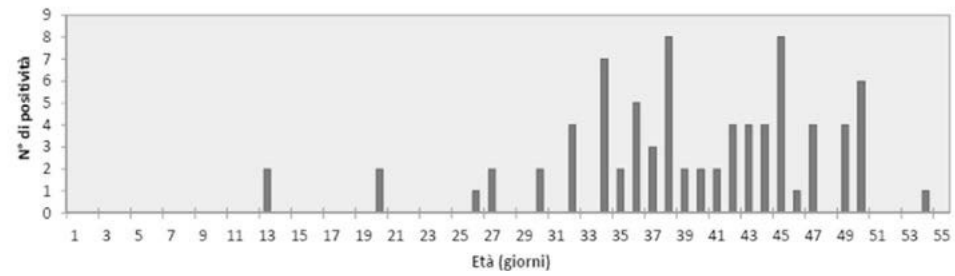


Figura 1: Distribuzione delle positività per aMPV in funzione dell'età degli animali.

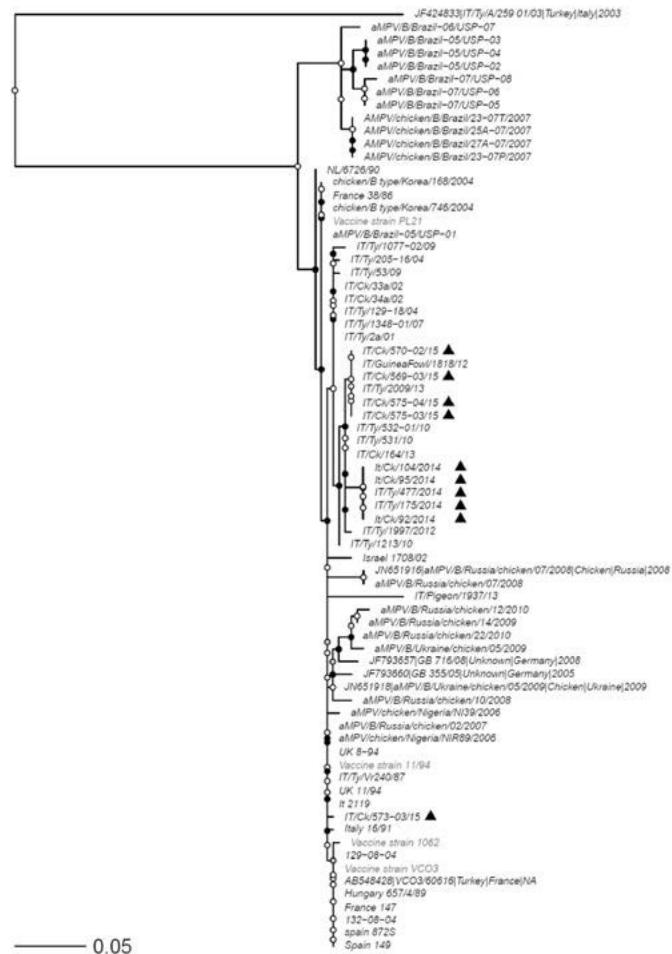


Figura 2: Albero filogenetico ricostruito con sequenze depositate e sequenze (identificate con un triangolo nero) provenienti da broiler, tacchini e dalla prova sperimentale ottenute in questo studio.

INDICE DEGLI AUTORI