

ENTERITE EMORRAGICA DEL TACCHINO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA

Lupini C., Mescolin G., Alastra G., Silveria F., Felice V., Catelli E.

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

Summary

Molecular characterization of two Italian turkey haemorrhagic enteritis virus (THEV) strains, detected in 2009 and 2016, was performed. ORF1, *fiber knob domain*, E3 and hexon genes were sequenced; sequences were aligned and compared with homologous sequences retrieved from *GenBank*. Italian THEV were closely related each other (99% identity) and possessed four peculiar nucleotide mutations in the hexon gene. Phylogenetic analysis of ORF1, *fiber knob domain* and E3 sequences showed a close relationship of the Italian isolates to field avirulent THEV strains.

INTRODUZIONE

L'enterite emorragica è una malattia virale del tacchino che colpisce soggetti a partire dalla quarta settimana di vita. In animali sensibili, la forma clinica è caratterizzata da depressione, morte improvvisa e feci sanguinolente. L'importanza economica di questa malattia è dovuta alla mortalità da essa provocata, che può raggiungere anche il 60%, ed alla immunodepressione transitoria ad essa associata che può favorire l'insorgenza di altre patologie. L'agente eziologico dell'enterite emorragica è *Turkey siadenovirus A* (THEV), genere *Siadenovirus*, famiglia *Adenoviridae*. Il virus ha un DNA lineare a doppio filamento, costituito da 26.263 pb e presenta un antigene di superficie principale denominato Exon.

Oltre ai ceppi virulenti, nell'allevamento del tacchino, comunemente si riscontrano ceppi di THEV considerati naturalmente apatogeni (THEV-A) in grado di replicare efficientemente, inducendo splenomegalia e immunosoppressione senza tuttavia provocare lesioni all'intestino e mortalità (Alkie et al., 2017; Beach et al., 2009a). L'analisi di sequenza di genomi completi di ceppi di THEV a diversa virulenza ha portato ad ipotizzare che le basi molecolari della patogenicità siano correlate a mutazioni riscontrate nei geni ORF1, E3 e *Fiber knob domain* (Beach et al., 2009b).

Scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare da un punto di vista molecolare, mediante analisi di sequenza i geni ORF1, E3, *Fiber knob domain* ed hexon, due ceppi di THEV evidenziati in allevamenti di tacchino del nostro Paese.

MATERIALI E METODI

Ceppi virali

Sono stati analizzati due ceppi italiani di THEV, evidenziati nel 2009 e nel 2016 (denominati rispettivamente THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16), in tacchini da carne di circa 10 settimane di età, vaccinati con vaccino spento (ceppo Domermuth) a 4 settimane.

Entrambi i gruppi non mostravano sintomatologia riferibile ad Enterite Emorragica.

Estrazione

L'estrazione del DNA virale è stata effettuata con il kit del commercio *QIAamp DNA Mini Kit*[®] (Qiagen), seguendo le istruzioni della casa produttrice, a partire da sospensioni di pool di tamponi cloacali in PBS, già risultati positivi a PCR per diagnosi THEV (Giovanardi *et al.*, 2014)

Amplificazione dei geni ORF1, E3, Fiber knob domain e Hexon

Per l'amplificazione dei geni ORF1, E3 e *Fiber knob domain* sono stati disegnati *primers* ad hoc (tabella 1), mentre per il gene Hexon, sono stati utilizzati i *primers* riportati da Hess *et al.*, 2009.

Analisi di sequenza

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Milano, Italia), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Madrid, Spain).

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate, mediante il *software* Bioedit, con sequenze omologhe di ceppi THEV presenti nel database *GenBank*. Gli alberi filogenetici sono stati quindi costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood del *software* Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). I valori di *bootstrap*, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

RISULTATI e DISCUSSIONE

Le PCR eseguite sui ceppi THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16 ed il successivo sequenziamento hanno permesso di ottenere le sequenze geniche delle dimensioni attese, in particolare: ORF 1 (nt 70-2.200), E3 (nt 21.070-22.300), *fiber knob domain* (nt 23.386-23.880) ed hexon (nt 13.610-16.330), pari a circa il 25% dell'intero genoma. L'analisi delle sequenze ha messo in evidenza una identità maggiore del 99% fra i due ceppi italiani analizzati. Sono state riscontrate unicamente 7 mutazioni nucleotidiche, di cui 6 codificanti. Si può quindi dedurre una stabilità genetica di THEV nel tempo.

Il paragone delle sequenze ottenute con le omologhe disponibili in *Genbank*, ha permesso di evidenziare, a livello di gene hexon, 4 mutazioni uniche dei ceppi Italiani (posizioni nucleotidiche nel gene hexon: 1472 T>C; 1889 C>T; 2093 A>T; 2423 A>G). L'albero filogenetico costruito con le sequenze del gene hexon conferma la peculiarità dei ceppi italiani che formano un cluster distinto dagli altri ceppi disponibili e dal ceppo vaccino le Domermuth (figura 1). Il riscontro di mutazioni peculiari, se confermato da un più ampio studio di epidemiologia molecolare, potrà risultare utile strumento per la differenziazione dei ceppi di campo dai ceppi vaccinali.

L'analisi filogenetica dei geni ORF1, E3 e *Fiber knob domain*, nei quali, secondo Beach *et al.* (2009b) risiedono le basi molecolari della virulenza di THEV, mostra come i ceppi italiani siano geneticamente vicini a THEV-A (figura 2). A supporto di quanto emerso dai dati molecolari è importante sottolineare che nei gruppi

di tacchini dove i virus erano stati evidenziati, erano assenti sintomatologia clinica e lesioni anatomopatologiche tipiche della Enterite Emorragica. Tuttavia è possibile avere informazioni conclusive sulle caratteristiche di virulenza dei ceppi analizzati solo a seguito di studi di patogenicità *in vivo* su tacchini sensibili.

BIBLIOGRAFIA

1. Alkie T.N., Guenther R. and S. Rautenschlein (2017) Molecular Characterization of Hemorrhagic Enteritis Viruses (HEV) Detected in HEV-Vaccinated Commercial Turkey Flocks in Germany. *Avian Diseases*, 61(1):96-101.
2. Beach, N. M., R. B. Duncan, C. T. Larsen, X. J. Meng, N. Sriranganathan, and F. W. Pierson. (2009a) Persistent infection of turkeys with an avirulent strain of turkey hemorrhagic enteritis virus. *Avian Diseases*. 53:370–375.
3. Beach N.M., Duncan R.B., Calvert T.L., Meng X.J., N. Sriranganathan and F.W. Pierson (2009b) Comparison of 12 turkey hemorrhagic enteritis virus isolates allows prediction of genetic factors affecting virulence. *Journal of General Virology*, 90, 1978–1985.
4. Giovanardi, D., C. Lupini, P. Pesente, G. Rossi, G. Ortali, and E. Catelli. (2014) Longitudinal field studies of avian metapneumovirus and turkey hemorrhagic enteritis virus in turkeys suffering from colibacillosis associated mortality. *Veterinary Research Communication*, 38:129–137. 2014.
5. Hess M, Raue R, Hafez HM (1999) PCR for specific detection of haemorrhagic enteritis virus of turkeys, an avian adenovirus. *Journal of Virological Methods*, 81:199–203
6. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and S Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.

Tabella 1 Primers utilizzati per amplificare i geni *ORF1*, *E3* e *Fiber*

Gene	Dimensione dell'amplificato	Primer <i>forward</i> (sequenza 5'-3')	Primer <i>reverse</i> (sequenza 5'-3')
ORF1	1150	GGATTCGGCTTGAAAAGTG	GGAGAATAAGTAATAGGC
	1215	GGAGTTGTGCACTTGTTTGC	CACTGCCAGCACCAACTAAG
	860	CAGGGTAGCGCTTTGTC	ACATGCGTTTTTGTTTTTCTTT
E3	1420	CATTGCCGACTATTGCAGAA	TAGACCGCTAGCAACACAGC
FIBER	915	GCCCTTTGTCAGCAGATGAT	TTCGCGCCACAGCATTACTA

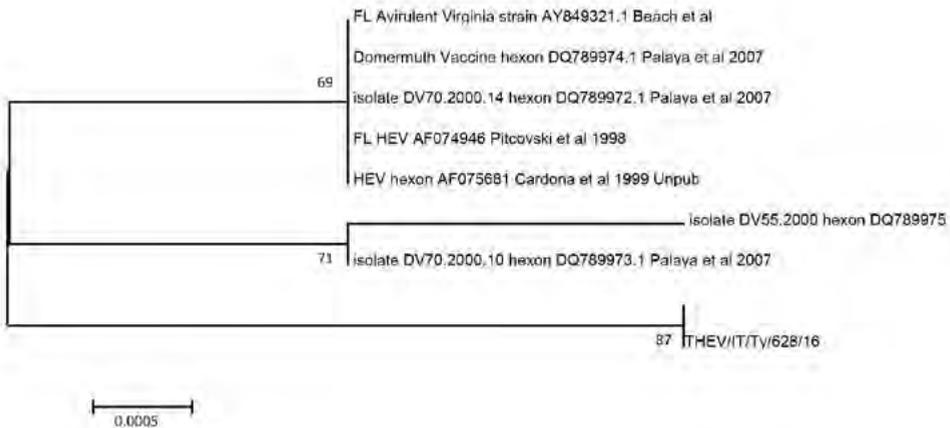


Figura 1. Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche del gene hexon dei ceppi THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16 analizzati in questo studio e dei ceppi di THEV presenti sul database *Genbank*.

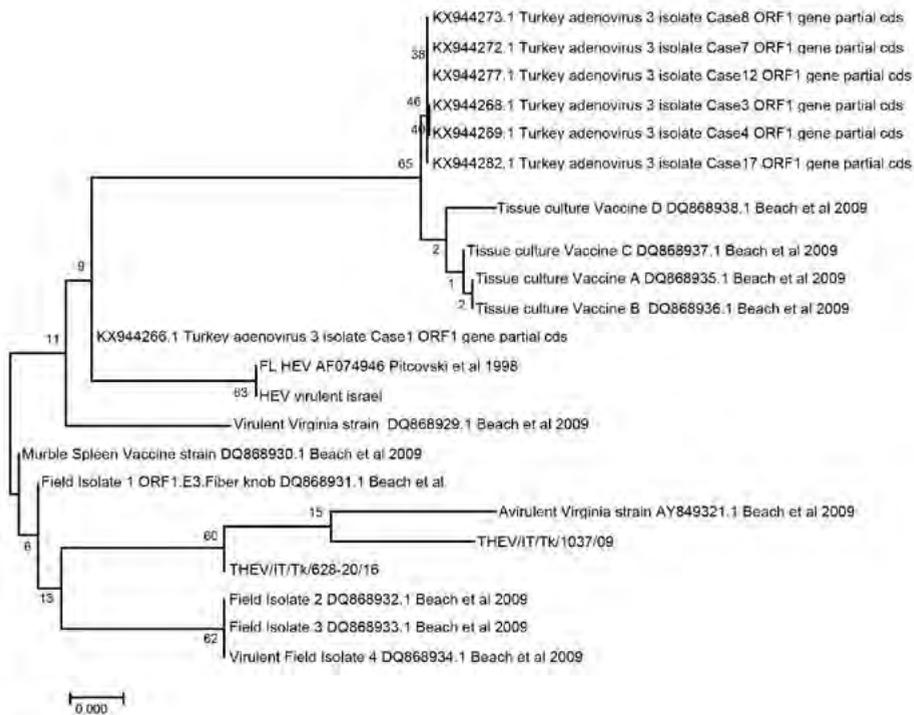


Figura 2. Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche del gene ORF1 dei ceppi THEV/IT/Ty/1037/09 e THEV/IT/Ty/628/16 analizzati in questo studio e dei ceppi di THEV presenti sul database *Genbank*.