

CARATTERIZZAZIONE DI UN CEPPLO DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK RILEVATO IN TACCHINI DA CARNE CON FORMA VISCERALE

Mescolini G.¹, Silveira F.¹, Lupini C.¹, Felice V.¹, Fiorentini L.², Tosi G.², Massi P.², Cecchinato M.³, 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.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione Diagnostica di Forlì, Via don Eugenio Servadei 3/E-3/F, 47122, Forlì (FC), Italia.

³ 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 (MD) is a lymphoproliferative disease caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), which affects primarily the chicken. The virus is able to induce tumours also in turkeys, even if this finding is relatively unusual when compared to the frequency of occurrence in chickens. This study reports the detection and the molecular characterization of a GaHV-2 strain from a flock of Italian meat-type turkeys showing visceral lymphomas. The *meq* gene was sequenced, aligned and compared with reference strains and with other Italian GaHV-2 detected in the last few years. Results showed that the turkey MD virus has molecular features of high virulence and is closely related to MD strains detected in Italian commercial chickens.

INTRODUZIONE

Il virus della malattia di Marek (MD) o *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2) è un herpesvirus appartenente alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, genere *Mardivirus*; l'ospite di elezione è il pollo dove il virus causa una patologia a carattere linfoproliferativo. Il virus riconosce quattro diversi patotipi denominati *mild*, *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus* (Schat e Nair, 2013).

Nel tacchino il virus è in grado di determinare forme tumorali sia a seguito di infezione sperimentale che naturale (Powell et al., 1984; Davidson et al., 2002; Pennycott and Venugopal, 2002; Deuchande et al., 2012; Blake-Dyke and Baigent, 2013). All'esame necroscopico i linfomi viscerali causati da GaHV-2 nel tacchino risultano indistinguibili da quelli determinati dal retrovirus della reticoloendoteliosi (REV) e da quello della malattia linfoproliferativa del tacchino (LPDV) (Schat e Nair, 2013; Nair et al., 2013). La diagnosi differenziale fra queste forme neoplastiche linfoproliferative non è sempre agevole poiché anche a livello istologico l'infiltrato può avere caratteristiche simili (Schat e Nair, 2013). Metodi molecolari specifici per GaHV-2, REV o LPDV, rappresentano quindi la scelta di elezione per la diagnosi.

Nel presente studio è riportato il riscontro e l'analisi molecolare di un ceppo di GaHV-2 in tacchini da carne allevati con metodo *free-range* ed affetti da lesioni viscerali neoplastiche.

MATERIALI E METODI

Campioni

Nel 2016 sono stati conferiti presso l'IZLER, Sezione di Forlì, fegati di tacchini da carne bianchi, di 3-4 mesi di età, per approfondimenti diagnostici. I visceri erano stati prelevati da animali allevati in provincia di Viterbo (Lazio) e si presentavano fortemente aumentati di volume e con aree discolorate. L'allevamento era condotto al chiuso fino a 50 giorni di età, quindi fino alla macellazione, che avveniva a 5 mesi di età, in aree all'aperto recintate dotate di tettoie in corrispondenza delle mangiatoie e degli abbeveratoi.

In zone contigue ai recinti venivano allevati anche polli da carne all'aperto.

Estrazione del DNA

Allo scopo di giungere a una diagnosi eziologica della forma linfoproliferativa, si è proceduto all'estrazione del DNA dai fegati mediante kit commerciale "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche).

PCR per REV e LPDV

Il DNA provirale è stato quindi sottoposto a protocolli di PCR in grado di amplificare tratti specifici del genoma di REV (Abdel-Latif e Khalafalla, 2005) o LPDV (Allison et al., 2014).

PCR per GaHV-2, sequenziamento, analisi di sequenza e filogenetica del gene meq

La PCR per GaHV-2 è stata eseguita seguendo il protocollo di Shamblin et al. (2004) che prevede l'amplificazione dell'intero gene *meq*.

I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati presso il centro di sequenziamento Macrogen Europe (Madrid). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit Sequence Alignment Editor, allineate e confrontate, utilizzando l'accessory application Clustal W, alle sequenze del gene *meq* di ceppi GaHV-2 di riferimento presenti in GenBank, ceppi di GaHV-2 rilevati recentemente in Italia in gruppi di ovaiole, riproduttori e broiler, e ceppi vaccinali tipo Rispens comunemente impiegati nel nostro Paese.

L'analisi delle sequenze amminoacidiche delle proteine Meq ha previsto il conteggio del numero delle sequenze di 4 proline (PPPP) all'interno delle ripetizioni ricche in prolina (Proline-Rich Repeats - PRR) nel dominio di transattivazione.

L'albero filogenetico è stato costruito sulle sequenze amminoacidiche del gene *meq* utilizzando l'algoritmo Neighbor-Joining col software MEGA7. Sono stati considerati attendibili i nodi dell'albero con valore di bootstrap, calcolato su 1000 replicati, uguale o maggiore di 70.

RISULTATI

Il campione è risultato negativo alle PCR per REV e LPDV mentre è risultato positivo al protocollo di PCR per GaHV-2, producendo una banda di amplificazione delle dimensioni attese. Il ceppo virale rilevato è stato denominato GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016.

All'analisi di sequenza è stato possibile osservare che il gene *meq* del ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 codificava per un'isoforma della proteina Meq di 339 amminoacidi, e presentava nel dominio di transattivazione 4 sequenze PPPP, ed una

sequenza PPSP. La presenza di interruzioni dovute a mutazioni puntiformi nelle sequenze ricche in prolina è indice di elevata virulenza del ceppo virale. All'analisi filogenetica (Figura 1) il ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 formava un cluster unico con i ceppi evidenziati negli allevamenti industriali italiani a partire dal 2015.

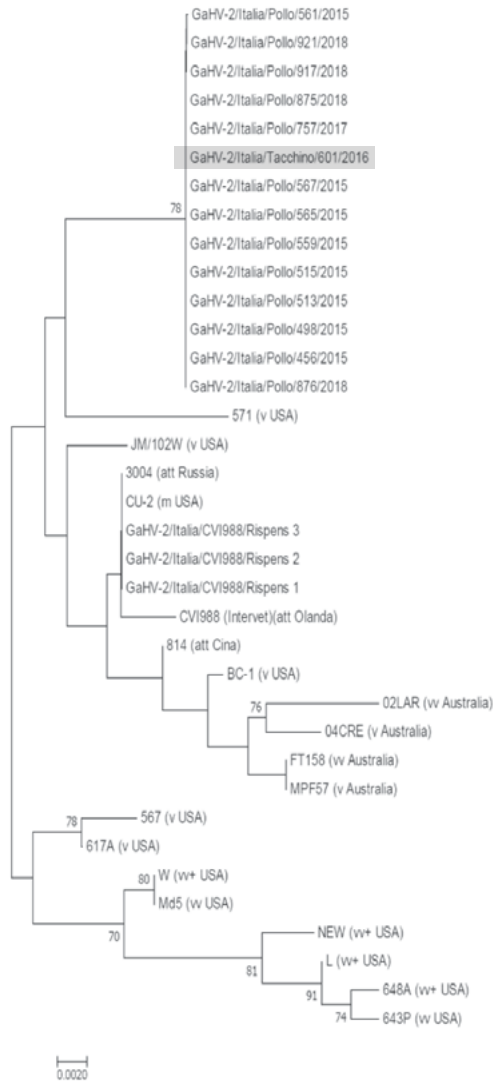


Figura 1. Albero filogenetico generato con le sequenze amminoacidiche del gene *meq* del ceppo di GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 (evidenziato in verde), di ceppi GaHV-2 di riferimento presenti in GenBank, di ceppi di GaHV-2 Italiani e di 3 vaccini tipo Rispens.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato caratterizzato, tramite l'analisi del gene *meq*, un ceppo di GaHV-2 evidenziato in tacchini da carne affetti da una forma viscerale di MD. I tacchini in questione erano allevati in parchetti esterni in contiguità con polli da carne, anch'essi allevati all'aperto.

Rare sono le segnalazioni di MD nel tacchino nonostante in generale sia riconosciuta la sensibilità di questa specie al GaHV-2. Ciò può essere attribuito da un canto alla presenza ubiquitaria in questa specie dell'herpesvirus del tacchino (HVT) che probabilmente conferisce un certo grado di protezione nei confronti della malattia (Witter and Solomon, 1971) dall'altro al fatto che le varie linee genetiche di tacchino hanno diversi gradi di resistenza alla malattia (Davidson et al., 2002).

Nel caso da noi riportato è presumibile che i soggetti siano stati sottoposti ad una elevata pressione infettiva per la presenza contigua di un allevamento di polli. L'analisi filogenetica ha mostrato una strettissima correlazione fra il virus in esame e quelli attualmente circolanti negli allevamenti industriali supportando tale ipotesi. Come noto il virus si trasmette per contatto diretto o indiretto in modo molto efficiente mediante le desquamazioni cutanee, che albergano particelle virali infettanti.

Il gene *meq*, principale oncogene del virus, è stato scelto per la caratterizzazione del ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 a causa della sua variabilità che è correlabile al grado di virulenza (LEE et al., 2000; Chang et al., 2002; Shamblin et al., 2004). Shamblin et al. (2004) hanno osservato che il numero delle ripetizioni ricche in prolina è significativamente correlato con il patotipo virale: i ceppi con un numero maggiore di PRR mostravano una virulenza minore ed i ceppi a maggiore virulenza contenevano un numero minore di PRR e l'interruzione delle stesse a causa della sostituzione di una prolina con un altro amminoacido nella sequenza di 4 proline in successione in posizione 2 (PPPP -> P (Q/A) PP). Il ceppo GaHV-2/Italia/Tacchino/601/2016 presentava nella proteina Meq caratteristiche di elevata virulenza a causa del basso numero di PRR nel dominio di transattivazione e un'interruzione di una sequenza di PPPP per la sostituzione di una P a S.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Latif MM and Al Khalafalla. (2005). Detection by PCR of Multiple Subgroups of Avian Leukosis Virus (ALV) in Broilers in the Sudan. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4, 407-413.
2. Allison AB, Kevin KM, Philips JE, Cartoceti AN, Munk BA, Nemeth NM, Welsh TI, Thomas JM, Crum JM, Lichtenwalner AB, Fadly AM, Zavala G, Holmes EC and JD Brown. (2014). Avian oncogenesis induced by lymphoproliferative disease virus: A neglected or emerging retroviral pathogen? *Virology* 450–451, 2–12.
3. Blake-Dyke C and S Baigent. (2013). Marek's disease in commercial turkey flocks. *Vet. Rec.* doi:10.1136/vr.f6229
4. Chang KS, Ohashi K and M Onuma. (2002). Suppression of transcription activity of the MEQ protein of oncogenic Marek's disease virus serotype 1 (MDV1) by L-MEQ of non-oncogenic MDV1. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1091–1095.
5. Davidson I, Malkinson M and Y Weisman. (2002). Marek's disease in turkeys. I. A seven-year survey of commercial flocks and experimental infection using two field isolates. *Avian Dis* 46, 314–321.

6. Deuchande R, Murphy A, Otter A, Baigent S, Wood A and RM Irvine. (2012). Marek's disease in turkeys. *Vet. Rec.* 171, 602.
7. 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. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 287-292.
8. Nair V, Zavala G and AM Fadly. (2013). Reticuloendotheliosis. In: Diseases of Poultry, 13th- Edition, Swayne D. E. et al., Eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 593-604.
9. Pennycott TW and K Venugopal K. (2002). Outbreak of Marek's disease in a flock of turkeys in Scotland. *Vet. Rec.* 150, 277-279.
10. Powell PC, Howes K, Lawn AM, Mustill BM, Payne LN, Rennie M and MA Thompson. (1984). Marek's disease in turkeys: The induction of lesions and the establishment of lymphoid cell lines. *Avian Pathol.* 13, 201-214.
11. Schat KA and V. Nair. (2013). Marek's Disease. In: Diseases of Poultry, 13th- Edition, Swayne D. E. et al., Eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 515-552.
12. Shamblin CE, Greene N, Arumugaswami V, Dienglewicz RL and Parcels MS. (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. *Vet. Microbiol.* 102, 147-167.
13. Witter RL and JJ Solomon. (1971). Epidemiology of a herpesvirus of turkeys: possible sources and spread of infection in turkey flocks. *Infect. Immun.* 4, 356-361.