

## MONITORAGGIO AMBIENTALE DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK IN ALLEVAMENTI DI BROILER E DI RI-PRODUTTORI PESANTI

Mescolini G.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>, Quaglia G.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Tovani A.<sup>3</sup>, Ceroni S.<sup>3</sup>, Muccioli F.<sup>3</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia.*

<sup>2</sup> *CEVA Salute Animale, Agrate Brianza (MB), Italia.*

<sup>3</sup> *Medico Veterinario.*

### Summary

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease of chickens spread throughout the world caused by *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2). Production losses resulting from clinical disease and MD-associated condemnation have been significantly reduced since the introduction of vaccination. The present study reports a GaHV-2 epidemiological survey conducted on Italian broiler and broiler-breeder birds vaccinated against MD. The virus was detected by a nested PCR protocol capable of amplifying the entire *meq* gene from environmental dust samples, allowing the molecular characterization of the detected GaHV-2 strains. Most viruses detected from the dust collected from broiler farms at the end of the production cycle were of vaccine origin, however, in 3 out of 22 farms, field viruses with molecular features of high virulence were detected. A broiler-breeder farm was monitored for four subsequent production cycles during the first 20 weeks of life of the birds. A highly virulent field virus was detected in all monitored cycles, despite the strictness of the cleaning and disinfection procedures applied. However, the time of infection of the birds was delayed and the amount of the environmental virus was reduced in the last two monitored cycles. Vaccination alone does not prevent the infection of birds with highly virulent viruses, therefore biosecurity measures remain essential for MD control.

### INTRODUZIONE

La malattia di Marek (MD) è una patologia neoplastica a carattere linfoproliferativo del pollo causata dal *Gallid alphaherpesvirus 2* (GaHV-2), che determina ingenti perdite economiche nel settore avicolo in tutto il mondo (Schat e Nair, 2013).

Le manifestazioni cliniche della malattia vengono tenute sotto controllo dalla vaccinazione con vaccini vivi attenuati che tuttavia vengono definiti "imperfetti" poiché non sono in grado di prevenire l'infezione (Read et al., 2015). I vaccini impiegati più largamente in Italia sono il ceppo CVI988/Rispens (attenuato a partire da un ceppo di GaHV-2) e l'herpesvirus del tacchino (HVT), appartenente alla specie *Meleagrid alphaherpesvirus 1*.

Gli ospiti recettivi si infettano tramite inalazione di particelle virali presenti nei detriti delle cellule epiteliali dei follicoli delle penne desquamate contenute nella polvere ambientale (Carrozza et al., 1973); il virus può permanere vitale ed infettante nelle polveri per diversi mesi (Jurajda e Klimes, 1970).

Negli allevamenti di ovaiole e riproduttori pesanti Italiani circolano ceppi ad elevata

virulenza in grado di determinare la forma acuta della malattia, caratterizzata da linfomi viscerali (Mescolini et al., 2019b) e di recente sono stati segnalati episodi di MD in allevamenti di broiler nelle forme cutanea, di paralisi transitoria e di “alabama redleg”.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati di un’indagine epidemiologica sulla circolazione e persistenza ambientale di GaHV-2 in diversi allevamenti di broiler ed in un allevamento di riproduttori pesanti colpito da elevata mortalità attribuibile a MD.

Il virus è stato evidenziato in campioni di polvere ambientale mediante un protocollo di PCR nested, in grado di amplificare il gene *meq*, principale oncogene di GaHV-2, che nella sua sequenza genomica contiene marker vaccinali e di virulenza.

## **MATERIALI E METODI**

### *Gruppi di broiler oggetto dello studio e campionamento*

Nel 2018 e nel 2019 sono stati campionati 40 gruppi di broiler allevati con metodo convenzionale o biologico, appartenenti a 22 allevamenti situati nelle seguenti regioni italiane: Emilia Romagna, Friuli- Venezia Giulia, Marche, Lazio, Puglia, Veneto. I gruppi campionati erano vaccinati per MD con vaccino monovalente HVT o con vaccino bivalente HVT+CVI988/Rispens, somministrato *in ovo* o al primo giorno di vita. La concentrazione di GaHV-2 nelle polveri aumenta nel tempo all’aumentare dell’età del gruppo (Kennedy et al., 2017), perciò, per incrementare le possibilità di rilevare il virus, il campionamento veniva eseguito a fine ciclo. Il campionamento consisteva, dove possibile, nel prelievo di polvere ambientale dalle griglie dei ventilatori (in modo da coprire l’intera area del capannone) o nella esecuzione di tamponi ambientali (garze inumidite) effettuati in diversi punti del capannone.

### *Gruppi di riproduttori pesanti oggetto dello studio e campionamento*

Nella stessa finestra temporale sono prelevati campioni di polvere ambientale dalla pulcinaia, costituita da 5 capannoni, di un allevamento di riproduttori pesanti in cui in passato si erano verificati focolai di MD acuta in fase di deposizione. Il campionamento è stato eseguito per quattro cicli consecutivi (I, II, III, IV) prelevando da ciascun capannone polvere ambientale come precedentemente descritto, o, quando il campionamento veniva eseguito post-pulizia e disinfezione, eseguendo tamponi ambientali da diverse superfici del capannone quali zone filtro, travi, abbeveratoi, tubature e ventilatori, con garze sterili inumidite. I tempi di campionamento sono riportati in Tabella 1. Al campionamento ambientale è stato associato un prelievo di penne dagli animali, se presenti al momento del campionamento. Sono stati selezionati in maniera casuale 5 animali per capannone campionandoli da tutta l’area del capannone da cui sono state prelevate penne con calami ricchi di polpa.

**Tabella 1.** Campionamenti ambientali eseguiti nella fase di pulcinaia dell'allevamento di riproduttori pesanti.

Età al campionamento (settimane)	Cicli			
	I°	II°	III°	IV°
Post-pulizia, Pre-accasamento	-	✓	✓	✓
3	-	✓*	-	-
8	-	✓*	✓*	-
9	-	-	-	✓*
12	-	✓*	-	-
13	-	-	-	✓*
16	-	-	✓*	-
20	✓	-	-	-
Pre-pulizia	-	✓	-	-
- Campionamento non effettuato; ✓ Campionamento effettuato; * Prelievo di penne.				

*Processazione del campione ed estrazione del DNA da polvere*

La polvere ( $1 \pm 0.09$  g) è stata posta in una provetta conica da centrifuga da 15 ml, risospesa in 5ml di PBS sterile e centrifugata a 2500g per 15 minuti a +4°C. Il surnatante ottenuto è stato centrifugato una seconda volta utilizzando gli stessi parametri. Dopo la seconda centrifugazione, il surnatante è stato prelevato con una siringa e filtrato attraverso un filtro sterile per siringa da 0.45 µm. I tamponi ambientali sono stati processati immergendoli in 10 ml di PBS sterile per 1 ora a temperatura di refrigerazione prima di procedere alla doppia centrifugazione ed alla filtrazione come sopra descritto. L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da 200µl di filtrato o da pool di 5 penne (prelevando la parte del calamo delle penne infissa nel follicolo), utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL).

*PCR nested per GaHV-2*

Allo scopo di aumentare la sensibilità di protocolli di PCR già descritti (Mescolini et al., 2016 e 2019a), nel presente lavoro è stato disegnato un protocollo di PCR nested che combina i precedenti e consente di amplificare il gene *meq* di GaHV-2. La prima PCR si avvale della coppia di primer EcoRQ for (5'-GGT GAT ATA AAG ACG ATA GTC ATG-3') e EcoR-Q rev (5'-CTC ATA CTT CGG AAC TCC TGG AG-3'), disegnati su regioni genomiche esterne al gene *meq* (Shamblin et al., 2004), la seconda PCR della coppia di primer interni: meq-F (5'-ATG TCT CAG GAG CCA GAG CCG-3') e meq-R (5'-GGG TCT CCC GTC ACC TGG-3') (Hassanin et al., 2013).

### *Sequenziamento ed analisi di sequenza del gene meq di GaHV-2*

I prodotti dell'amplificazione sono stati purificati usando ExoSAP-IT *Express* PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) e successivamente sequenziati (Macrogen, Madrid, Spain). Mediante il software Bioedit Sequence Alignment Editor le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate con sequenze del gene *meq* di ceppi GaHV-2 di riferimento a patotipo noto presenti nel database GenBank, e con sequenze di ceppi rilevati in corso di focolai di MD in Italia (Mescolini *et al.*, 2019a e 2019b). Le sequenze amminoacidiche ottenute sono state analizzate per la ricerca di marker vaccinali e di virulenza (Mescolini *et al.*, 2019b). L'albero filogenetico è stato costruito utilizzando il metodo Maximum Likelihood nel software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando  $\geq 70$ .

### **RISULTATI**

Il 70% (28/40) dei gruppi di broiler campionati sono risultati positivi alla PCR nested per GaHV-2. Il 68% delle positività rilevate è risultato ascrivibile a GaHV-2 di origine vaccinale (CVI988/Rispens) sia all'analisi di sequenza che filogenetica. Il restante 32% delle positività è risultato ascrivibile a GaHV-2 di campo, aventi caratteristiche molecolari di elevata virulenza e sequenza del gene *meq* identica. Tali virus di campo sono stati evidenziati solo in tre allevamenti di cui due siti in Friuli-Venezia Giulia ed uno in Puglia.

I risultati dell'indagine svolta nell'allevamento di riproduttori sono riportati in Tabella 2. Il 100% dei campioni di polvere è risultato positivo per GaHV-2. Il 75% dei campioni è risultato positivo al solo virus di origine vaccinale (CVI988/Rispens), il 18% è risultato positivo al solo virus di campo, mentre il 7% è risultato positivo ad entrambi. Il 9% dei tamponi ambientali sono risultati positivi per GaHV-2, con il 75% delle positività ascrivibile a ceppo di campo ed il 25% a ceppo di origine vaccinale. All'analisi di sequenza i ceppi di campo presentavano sequenza del gene *meq* identica, con caratteristiche molecolari di elevata virulenza.

All'analisi filogenetica i ceppi di campo rilevati sia nei broiler che nei riproduttori rientravano all'interno di un unico cluster contenente ceppi rilevati, negli ultimi cinque anni, in corso di focolai di MD acuta in allevamenti industriali e rurali Italiani (Figura 1). I ceppi che all'analisi di sequenza risultavano di origine vaccinale rientravano tutti in un unico cluster contenente il ceppo vaccinale CVI988/Rispens.



**Figura 1.** Albero filogenetico basato sulla sequenza aa del gene *meq* di ceppi di riferimento a patotipo noto, ceppi di campo rilevati in corso di focolai di MD in Italia (Mescolini et al., 2019a e 2019b) e dei ceppi rilevati nelle polveri di allevamenti di broiler (p) e riproduttori pesanti (●) nel presente studio.

**Tabella 2.** Positività alla PCR nested per GaHV-2 nell'allevamento di riproduttori pesanti.

Età al campionamento (settimane)	Cicli						
	I°	II°		III°		IV°	
	Polvere	Polvere/ tamponi	Penne	Polvere/ tamponi	Penne	Polvere/ tamponi	Penne
Post-Pulizia	-	4/20 *	-	0/15	-	0/10	-
3	-	4/4	5/5 *	-	-	-	-
8	-	5/5	4/5	5/5	5/5	-	-
9	-	-	-	-	-	5/5	4/5*
12	-	5/5	5/5 *	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	5/5*	3/5
16	-	-	-	5/5 *	3/5 *	-	-
20	5/5 *	-	-	-	-	-	-
Pre-pulizia	-	5/5 *	-	-	-	-	-

- Campionamento non effettuato;

n/n n. positivi/n. campionati;

\* Almeno un campione positivo al ceppo di campo.

## DISCUSSIONE

In questo studio è stata valutata la circolazione di GaHV-2 in gruppi di broiler Italiani tramite analisi molecolari su polvere ambientale prelevata a fine ciclo produttivo. Più dei due terzi delle positività per GaHV-2 riscontrate erano ascrivibili al ceppo vaccinale CVI988/Rispens mentre le restanti positività erano ascrivibili a ceppi di GaHV-2 aventi caratteristiche molecolari di elevata virulenza e geneticamente identici tra loro. La circolazione di virus di campo ed elevata virulenza nell'allevamento del broiler conferma la necessità, in Italia, di vaccinare per la MD anche questa categoria produttiva. Per garantire la protezione nei riguardi di forme cliniche da virus ad elevata virulenza la recente letteratura (Gimeno, 2008; Gimeno et al., 2015) suggerisce l'impiego della associazione vaccinale CVI988/Rispens + HVT, al solo vaccino HVT. Ciò è valido a maggior ragione nei gruppi di broiler allevati con metodo biologico, che prevede tempi di allevamento prolungati e restrizioni nell'impiego dei detergenti e disinfettanti.

In secondo luogo è stata valutata la persistenza ambientale del GaHV-2 monitorando 4 cicli produttivi successivi di un allevamento di riproduttori pesanti in fase pollastra. Nonostante siano state applicate alla fine di ogni ciclo procedure di pulizia e disinfezione estreme, che prevedevano tra l'altro la flambatura delle superfici, in tutti i cicli consecutivi monitorati è stato rilevato persistentemente un ceppo di campo ed elevata virulenza. Grazie alle analisi molecolari eseguite in parallelo

su penne, è stato possibile osservare come nel tempo il momento dell'infezione degli animali con il ceppo di campo sia stato posticipato da 3 settimane di età (II ciclo produttivo) a 9-16 settimane di età (III e IV ciclo produttivo). Nelle polveri e nelle penne raccolte nel IV ciclo produttivo, ceppi di campo e vaccinali sono stati evidenziati assieme nello stesso campione. Ciò suggerisce una ridotta circolazione del ceppo di campo. La riduzione della carica virale ambientale, che ha di conseguenza reso più difficoltoso il raggiungimento della dose infettante minima per gli animali, può essere ragionevolmente imputata ad un incremento progressivo della efficacia delle misure di pulizia e disinfezione rigorosamente applicate. L'efficacia delle suddette procedure è avvalorata dall'esito negativo delle analisi molecolari effettuate alla fine del III e IV ciclo produttivo post-pulizia e disinfezione (tamponi ambientali). Questi risultati indicano l'assenza nei cicli suddetti del virus all'accasamento degli animali. La successiva positivizzazione potrebbe essere attribuita ad una nuova introduzione del virus o alla sua persistenza non rivelata con il protocollo di campionamento utilizzato. Importante sottolineare che parte del personale operante nella pulcinaia non è dedicato, ma opera anche negli relativi allevamenti di riproduzione, in cui si erano verificati focolai di MD in forma viscerale.

## CONCLUSIONI

Le analisi molecolari svolte nel presente studio hanno evidenziato come in gruppi italiani di broiler e riproduttori pesanti vaccinati circolino ceppi di GaHV-2 con caratteristiche molecolari di elevata virulenza, possibile causa di forme cliniche, confermando che i vaccini attualmente in commercio non sono in grado di impedire l'infezione e la eliminazione virale. Rimane quindi di capitale importanza l'applicazione di protocolli di pulizia e disinfezione efficaci e rigorosi per controllare, e possibilmente azzerare, la pressione infettiva ambientale, e di stringenti misure di biosicurezza per evitare la reintroduzione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Carrozza JH, Fredrickson TN, Prince RP and RE Luginbuhl. (1973). Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease. *Avian Dis.* 17: 767-781.
2. Gimeno IM. (2008) Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? *Vaccine* 26 Suppl 3:C31-41.
3. Gimeno IM, Cortes AL, Faiz NM, Barbosa T and T Villalobos. (2015). Evaluation of Factors Influencing Efficacy of Vaccine Strain CVI988 Against Marek's Disease in Meat-Type Chickens. *Avian Dis.* 59:400-409.
4. 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 Dis.* 57: 555-561.
5. Jurajda V and B Klimes. (1970) Presence and survival of Marek's disease agent in dust. *Avian Dis.* 14:188-190.
6. Kennedy DA, Cairns C, Jones MJ, Bell AS, Salathé RM, Baigent SJ, Nair VK, Dunn PA and AF Read. (2017) Industry-Wide Surveillance of Marek's Disease Virus on Commercial Poultry Farms. *Avian Dis.* 61:153-164.
7. Mescolini G, Lupini C, Bellinati L, Felice V, Listorti V, Massi P, Tosi G, Rossi

- G, Pesente P, Cecchinato M and E Catelli. (2016). Epidemiologia molecolare del virus della Malattia di Marek in Italia nel 2014-2016. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2016. Tavola Rotonda SIPA. Parma, 23 settembre 2016. pp 205-217.
8. Mescolini G, Lupini C, Felice V, Guerrini A, Silveira F, Cecchinato M and E Catelli. (2019a). Molecular characterization of the meq gene of Marek's disease viruses detected in unvaccinated backyard chickens reveals the circulation of low- and high-virulence strains. *Poult Sci.* 98: 3130-3137.
  9. Mescolini G, Lupini C, Davidson I, Massi P, Tosi G and E Catelli. (2019b). Marek's disease viruses circulating in commercial poultry in Italy in the years 2015-2018 are closely related by their meq gene phylogeny. *Transbound Emerg Dis.* [Epub ahead of print]
  10. Read AF, Baigent SJ, Powers C, Kgosana LB, Blackwell L, Smith LP, Kennedy DA, Walkden-Brown SW and VK Nair. (2015) Imperfect Vaccination Can Enhance the Transmission of Highly Virulent Pathogens. *PLOS Biology* 13: e1002198.
  11. Schat KA and V Nair. (2013). Marek's disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, and V Nair (Eds.), *Diseases of Poultry* 13th edn, Wiley-Blackwell Publishing, Ames, pp.515-552.
  12. 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. *Vet. Microbiol.* 102, 147-167.