

## EVIDENZE SIEROLOGICHE DI CIRCOLAZIONE DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO C IN GERMANI REALI IN NORD ITALIA

Legnardi M.<sup>1</sup>, Allée C.<sup>2</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>, Brown P.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Viale dell'Università, 16, 35020, Legnaro (PD), Italy

<sup>2</sup> VIPAC Unit, Anses (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, B.P.53, 22440 Ploufragan, France

### Summary

Avian metapneumovirus (aMPV) is a single-stranded negative-sense RNA virus which causes respiratory and reproductive signs in different avian species, bearing a significant economic impact especially on turkey farming. To date, four subtypes (A, B, C and D) have been described, which differ generically, antigenically and in terms of host range. Subtype C viruses are further divided into two lineages, a North American turkey-adapted lineage and a Eurasian lineage affecting ducks.

To assess the presence of the different subtypes in Northern Italy, a serological survey was performed in summer 2019 on 10 Pekin duck flocks and one mallard flock. For each flock, 20 blood samples were taken at slaughter. Sera were then analyzed with a panel of ELISAs to detect antibodies specific to subtype A, B and C.

All Pekin ducks were negative for every subtype, however all mallard sera tested positive for aMPV-C. Anamnestic data about the positive flock were recovered retrospectively. The animals were reared indoors and slaughtered at 130 days. They had not been vaccinated for aMPV and no clinical signs were reported during the production cycle.

This pilot study presents the first serological evidence of aMPV-C presence in ducks in Italy, where the only currently circulating subtype according to recent studies is aMPV-B. Besides intensive raised ducks, this work also has implications on the possible role of wild waterfowl in aMPV spreading and circulation. Further research efforts will be targeted towards the screening of a larger panel of samples, possibly including other susceptible species, to obtain virus isolates and the genome sequences of these viruses.

### INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV) è un virus a singolo filamento di RNA a polarità positiva e dotato di *envelope*, unico esponente dell'omonimo genere della famiglia *Pneumoviridae* oltre al Metapneumovirus umano (hMPV) (1). Descritto per la prima volta nel 1979 in Sud Africa (2), è oggi ampiamente diffuso a livello globale.

aMPV è l'agente eziologico di una sindrome respiratoria dalla presentazione caratteristica ma non patognomonica a cui ci si riferisce con diversi nomi, tra cui rinotracheite aviare (ART), rinotracheite del tacchino (TRT), e, nel pollo, sindrome della testa gonfia (SHS). Il virus è inoltre associato a problematiche riproduttive con ripercussioni negative sulla produzione e qualità delle uova. L'impatto economico e sanitario del virus è di particolare rilevanza per l'allevamento del tacchino, ma una crescente attenzione e preoccupazione nei confronti di aMPV si osserva anche nel settore del pollo da carne (3). Tra le specie, domestiche o selvatiche, suscettibili o

risultate positive con metodiche molecolari ad aMPV si annoverano anche anatre, oche ed altri anatidi, gabbiani, faraone e passeri (4, 5, 6); una sierconversione a seguito dell'esposizione al virus è stata inoltre osservata in piccioni, struzzi, fagiani, corvidi e varie altre specie (7, 8, 9).

Sono ad oggi noti quattro distinti sottotipi di aMPV (A, B, C e D), i quali differiscono a livello genetico, antigenico e in termini di localizzazione geografica e di spettro d'ospite: aMPV-A e -B sono i due sottotipi di maggior rilevanza, e appartengono ad un cluster separato rispetto ad aMPV-C, il quale è geneticamente più vicino a hMPV, con cui si ipotizza condivida l'origine (10). All'interno del sottotipo C sono inoltre individuabili due *lineage*, uno ritrovabile in Nord America ed uno in Europa e Asia (11). Il sottotipo D è infine stato identificato una sola volta, retrospettivamente, in campioni francesi degli anni '80 (12).

Tra i diversi sottotipi esistono marcate differenze in termini di spettro d'ospite: in un recente studio che prevedeva una serie di infezioni sperimentali con i diversi sottotipi, i tacchini sono risultati sensibili ai sottotipi A, B, D ed al *lineage* Nordamericano di aMPV-C; nelle anatre l'unica suscettibilità osservata è stata quella nei confronti del *lineage* Eurasiatico del sottotipo C; nel pollo, i sottotipi A e B sono stati in grado di indurre sintomatologia, mentre il sottotipo D ha determinato una sierconversione ed è stato possibile isolare aMPV-C, seppur in assenza di sierconversione o di positività a livello molecolare (13). In uno studio precedente, un ceppo classificato come aMPV-C è stato isolato in Cina in broiler con sintomatologia respiratoria (14), ma non è possibile determinare a quale dei due *lineage* appartenesse.

Il quadro epidemiologico di aMPV presenta alcuni punti che restano ancora oscuri, in primis in merito al grado di suscettibilità di varie specie minori e al possibile coinvolgimento di animali selvatici migratori nella diffusione del virus.

Per ottenere informazioni riguardo la potenziale circolazione dei vari sottotipi in Italia, uno studio pilota è stato condotto con metodiche sierologiche specifiche su anatre allevate intensivamente nel Nord Italia.

## **MATERIALI E METODI**

I campioni di sangue destinati all'analisi sono stati prelevati in un macello di anatre durante l'estate del 2019. Per ogni gruppo di animali sono stati prelevati 20 campioni, a cui sono state associate informazioni riguardo la specie, la località dell'allevamento d'origine, il sesso e l'età alla macellazione.

I sieri così ottenuti sono stati conservati a -20°C fino al momento delle analisi, che sono state precedute da un trattamento al caolino per evitare di incorrere in reazioni aspecifiche.

I campioni sono stati quindi sottoposti ad un pannello di saggi ELISA indiretti *in-house*, ciascuno specifico per un determinato sottotipo, presso i laboratori ANSES di Ploufragan-Plouzané-Niort, seguendo le metodiche descritte da Giraud et al. (15). Come controlli sono stati utilizzati sieri di anatra, uno negativo e altri tre rispettivamente positivi ad anticorpi specifici per i sottotipi A, B e C.

## **RISULTATI**

Sono stati analizzati un totale di 220 sieri, prelevati da dieci gruppi di anatre Pechino (*Anas platyrhynchos domesticus*) e da uno di germani reali (*Anas platyrhynchos*), tutti provenienti da allevamenti situati in Veneto e Lombardia.

Sette dei gruppi di anatre Pechino erano composti interamente da femmine ed erano stati macellati ad un'età compresa tra i 58 e 66 giorni, mentre i tre gruppi di animali maschi erano stati macellati tra gli 87 e gli 89 giorni. I germani reali, il cui gruppo era composto da animali di entrambi i sessi, era stato macellato a 130 giorni.

La totalità delle anatre è risultata negativa a ciascuno dei tre sottotipi testati, mentre tutti i germani reali sono risultati positivi al sottotipo C. Sei germani sono risultati inoltre positivi borderline per aMPV-B, ed uno anche per aMPV-A.

I dati anamnestici riguardanti il gruppo di germani reali sono stati ottenuti retrospettivamente. Gli animali erano stati allevati al chiuso per l'intero ciclo produttivo, durante il quale non è stata osservata alcuna sintomatologia.

## DISCUSSIONE

Quelle riportate sono le prime evidenze sierologiche della presenza di aMPV-C in Italia, paese dove l'unico sottotipo di cui è riportata la circolazione è attualmente aMPV-B (16, 17). Va però puntualizzato come quasi tutti gli studi epidemiologici su aMPV si focalizzano su tacchini e polli e sui due sottotipi (A e B) più frequentemente riscontrati in Europa, mentre la situazione in merito ad anatre ed altre specie minori è pressoché sconosciuta.

Ad oggi, aMPV-C è stato ritrovato solo in Nord America, Asia ed Europa, dove è segnalato quasi esclusivamente in Francia (3). Basandosi sulla localizzazione geografica e sulla specie in cui sono stati rinvenuti, il rinvenimento di anticorpi contro aMPV-C qui riportato è plausibilmente da addursi ad un'infezione con un ceppo appartenente al *lineage* Eurasiatico adattato agli anatidi. Per confermare questa ipotesi, è però necessaria una caratterizzazione di tipo molecolare.

Tra gli animali investigati, solo i germani reali sono risultati sierologicamente positivi ad aMPV, pur in assenza di sintomatologia di alcun tipo. La suscettibilità dei germani reali ad aMPV-C era già stata riscontrata in uno studio di van Boheemen et al. (18), in cui questo sottotipo era stato ritrovato in un esemplare selvatico in Olanda. Nonostante gli animali positivi provenissero da un allevamento intensivo, i risultati di questo studio sembrano corroborare l'ipotesi che gli uccelli acquatici, specie se migratori, possano avere un ruolo nella diffusione e nella circolazione di aMPV (9, 19). Ciò avrebbe implicazioni di notevole importanza, se si considera come i germani reali siano tra gli uccelli selvatici più diffusi in natura, specialmente in un'area densamente popolata di allevamenti avicoli come la Pianura Padana (20).

Riguardo alle positività riscontrate in alcuni germani reali nei confronti di aMPV-B, e in un caso anche di aMPV-A, esse sono state considerate come reazioni aspecifiche. Il rinvenimento di anticorpi contro il sottotipo C tramite l'uso di metodiche ELISA specifiche per i sottotipi A e B è già stato descritto, ed è anzi il motivo per cui aMPV-C è stato scoperto (21).

## CONCLUSIONI

I risultati presentati hanno permesso di evidenziare la possibile circolazione di aMPV-C in anatre allevate intensivamente in Nord Italia. Ciononostante, questo lavoro va inteso come uno studio pilota, le cui conclusioni vanno corroborate ed espanse attraverso ulteriori ricerche su più larga scala e focalizzate all'identificazione e caratterizzazione molecolare di ceppi appartenenti al sottotipo C. Considerando le tipicità dell'avicoltura italiana, in cui non è raro che specie diverse vengano allevate

in stretta prossimità, l'estensione dello studio ad altre specie suscettibili potrebbe risultare di grande interesse.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la dottoressa Piraska Sabbion per il supporto organizzativo ed esecutivo offerto durante la fase di campionamento e la dottoressa Stefania Laverta per aver fornito i dati anamnestici relativi al gruppo di germani reali indagato.

## BIBLIOGRAFIA

1. Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Dempsey DM, Dutilh BE, Harrach B, Harrison RL, Hendrickson RC, Junglen S, et al. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch. Virol.* 164:2417–2429.
2. Buys SB and JH du Preez. (1980). A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys* 36:46.
3. Rautenschlein S. Avian metapneumovirus. (2020). In: David E. Swayne, editor-in-chief. *Diseases of Poultry 14<sup>th</sup> Edition*. Hoboken (NJ): Wiley Blackwell. pp. 135-143.
4. Bennett RS, McComb B, Shin HJ, Njenga MK, Nagaraja KV and DA Halvorson. (2002). Detection of Avian Pneumovirus in Wild Canada Geese (*Branta canadensis*) and Blue-Winged Teal (*Anas discors*). *Avian Dis.* 46:1025-1029.
5. Bennett RS, Nezworski J, Velayudhan BT, Nagaraja KV, Zeman DH, Dyer N, Graham T, Lauer DC, Njenga MK and DA Halvorson. (2004). Evidence of Avian Pneumovirus Spread Beyond Minnesota Among Wild and Domestic Birds in Central North America. *Avian Dis.* 48:902-908. <https://doi.org/10.1637/7208-051804R>
6. Cecchinato M, Lupini C, Silveira F, Listorti V, Mescolini G, Morandini E, Franzo G and E Catelli. (2018). Molecular characterization of avian metapneumovirus from Guinea fowls (*numida meleagris*). *Pak. Vet. J.* 38:419–423. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2018.088>
7. Cadman H, Kelly P, Zhou R, Davelaar F and P Mason. (1994). A Serosurvey Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibodies against Poultry Pathogens in Ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Dis.*, 38:621-625. [doi:10.2307/1592088](https://doi.org/10.2307/1592088)
8. Catelli E, Terregino C, De Marco MA, Delogu M and V Guberti. (2001). Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Vet. Rec.* 149:56-58.
9. Turpin EA, Stallknecht DE, Slemons RD, Zsak L and DE Swayne. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathol.* 37:343-351. [doi:10.1080/03079450802068566](https://doi.org/10.1080/03079450802068566)
10. Luo L, Sabara MI and Y Li. (2009). Analysis of antigenic cross-reactivity between subgroup C avian pneumovirus and human metapneumovirus by using recombinant fusion proteins. *Transbound. Emerg. Dis.* 56:303-310. [doi:10.1111/j.1865-1682.2009.01085.x](https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01085.x)

11. Toquin D, Guionie O, Jestin V, Zwingelstein F, Allee C and N Eterradossi. (2006). European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*. 32:97–103. doi: 10.1007/s11262-005-5850-3.
12. Bayon-Auboyer MH, Arnauld C, Toquin D and N Eterradossi. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 2000 81:2723-2733. doi:10.1099/0022-1317-81-11-2723
13. Brown PA, Allée C, Courtillon C, Szerman N, Lemaitre E, Toquin D, Mangart JM, Amelot M and N Eterradossi. (2019). Host specificity of avian metapneumoviruses. *Avian Pathol.* 48(4):311-318. doi:10.1080/03079457.2019.1584390
14. Wei L, Zhu S, Yan X, Wang J, Zhang C, Liu S, She R, Hu F, Quan R and J Liu. (2013). Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1092-1094. doi: 10.3201/eid1907.121126
15. Giraud P, Toquin D, Picault JP, Guittet M and G Bennejean. (1987). Utilisation de la méthode ELISA pour le sérodiagnostic de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse chez la dinde, la poule et la pintade. *Bull. Lab. Vét.* 27-28:65-70.
16. Mescolini G, Lupini C, Franzo G, Quaglia G, Legnardi M, Cecchinato M, Tucciarone CM, Blanco A, Turblin V, Blarnés M, Tatone F, Falchieri M and E Cattelli. (2020). What is new on molecular characteristics of Avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transbound. Emerg. Dis.* 00: 1– 9. <https://doi.org/10.1111/tbed.13788>
17. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Torres Alejo C, Listorti V, Mescolini G, Brandao PE, Martini M, Cattelli E and M Cecchinato. (2018). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97:503–509.
18. van Boheemen S, Bestebroer TM, Verhagen JH, Osterhaus ADME, Pas SD and RAM Fouchier. (2012). A Family Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study. *PLOS ONE* 7: e34961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034961>
19. Cha RM, Yu Q and L Zsak. (2013). The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. *Virol. J.* 10:38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-38>
20. Baratti M, Baccetti N, Cordaro M, Mori A and F Dessi-Fulgheri. (2015). Investigating the puzzling genetic structure of mallard populations (*Anas platyrhynchos* L.) in Italy. *Eur. J. Wildl. Res.* 61: 81–89. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0876-2>
21. Cook JKA and D Cavanagh. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol.* 31:117-132. doi:10.1080/03079450120118603