

CONTRIBUTO DELLA VIA ALIMENTARE ALLA CIRCOLAZIONE DEL CEPPPO PHY-LMV42 DELLA MALATTIA DI NEWCASTLE IN RAPACI SELVATICI

Samarelli R.¹, Schiavone A.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Lombardi R.¹⁻², Siddique I.¹, Camarda A.¹⁻²

¹ *Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S.P. per Casamassima km 3, 70010 Valenzano (BA), Italia*

² *Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia, Bitetto, Bari, Italy*

Summary

Newcastle Disease (ND), sustained by Avian Paramyxovirus-1 (APMV-1), has a high spreading capacity and a broad host spectrum that includes many species of wild birds which represent a natural reservoir both for pathogenic and vaccine strains.

Wildlife Rescue Centers can offer easy opportunities for viral exchange between individuals of different species, with potential consequences, both during the hospitalization phase and after the release into the wild.

A serological screening of hospitalized animals was carried out at the Osservatorio Faunistico Regionale (OFR), the Apulian Wildlife Rescue Center, as part of routine monitoring of infectious and diffusive diseases.

The survey involved 120 birds of different species and showed a serological positivity of 16.66% towards NDV, but the animals showed no clinical signs, suggesting the hypothesis of the circulation of a low pathogenic strain into the facilities of the center. In order to identify the common source of NDV infection, biomolecular tests were carried out on chicken meat usually administered as food to the animals of the OFR which showed, by RT-PCR, a positivity towards a strain of APMV-1. Phylogenetic investigations ascertained that it was the low virulence PHY-LMV42 strain, used for the preparation of a vaccine commonly employed in poultry farming systems in Italy and in many other countries, thus suggesting the involvement of the food route as a source of transmission of the NDV.

INTRODUZIONE

La Malattia di Newcastle (ND), o Pseudopeste aviare che è sostenuta dall'Avian Paramyxovirus-1 (APMV-1), è tra le malattie a maggior impatto per l'economia dell'industria avicola. Il suo agente eziologico, che si caratterizza per l'elevata capacità di diffusione tra i volatili, manifesta uno spettro d'ospite ampio, che comprende moltissime specie di uccelli selvatici, sia stanziali che migratori [1]. Questi volatili rappresentano una fonte importante di diffusione del virus nei diversi continenti, e di endemizzazione in aree più ristrette, da cui la malattia periodicamente riparte [2,3]. L'impiego oramai consolidato dei vaccini e l'adozione di misure di biosicurezza rigorose [4] hanno contribuito, nei paesi ad elevata vocazione avicola, a ridurre l'impatto esercitato dal virus negli allevamenti [5]. Esso, invece, ha continuato a propagarsi liberamente in ambiente selvatico [6].

Tra l'avifauna selvatica, oltre a ceppi dotati di potenzialità patogena [7] ne circolano molti di origine vaccinale [8], quali LaSota e Hitchner B1 [9], ma anche V4 e PHY-LMV42, isolati in particolare da columbiformi e anseriformi [10]. L'impatto reale di questa circolazione virale in ambiente selvatico non è ancora ben conosciuto. Tuttavia, nonostante i ceppi vaccinali siano stabili e poco inclini a fenomeni di mutazione e reversione, è noto che la comparsa di nuovi virus patogeni passa proprio attraverso mutazioni puntiformi in posizioni strategiche della proteina F, a partire da virus a bassa patogenicità [11], come accaduto in Australia negli anni 1998-2000 [12].

Oltre alla trasmissione orizzontale diretta, anche la via alimentare può rappresentare una fonte di trasmissione del virus, soprattutto per i rapaci di medie e grandi dimensioni, da falconeria e selvatici, che si alimentano abitualmente di specie serbatoio, tra i quali vi sono, ad esempio, anche colombi e tortore [13,14]. Ovviamente, nelle strutture dove vi è grande concentrazione e promiscuità di fauna selvatica, il rischio epidemiologico aumenta enormemente. I centri di recupero possono offrire facili occasioni di scambio di virus tra individui di specie diverse, i quali spesso, in condizioni immunitarie e di salute precarie, sono costretti a lunghe degenze in ambienti ristretti e spesso condivisi. In questi contesti il controllo della diffusione delle malattie infettive diviene, pertanto, un obiettivo centrale al fine di scongiurare impatti diretti e indiretti sugli animali, sia durante la fase di ricovero che successivamente, dopo il loro rilascio in natura.

Al fine di verificare l'eventuale circolazione del virus della Malattia di Newcastle è stato effettuato uno screening sierologico negli animali ricoverati presso il Centro Regionale di Recupero della Fauna Selvatica della Puglia. L'indagine è stata poi approfondita, al fine di verificare l'origine potenziale del contatto tra volatili e virus che potrebbe aver determinato la sieroconversione.

MATERIALI E METODI

Sono stati campionati 120 esemplari di avifauna selvatica ricoverati presso il Centro di Recupero della Fauna Selvatica annesso all'Osservatorio Faunistico Regionale della Puglia (OFR) e appartenenti a 29 specie di 7 diversi ordini (Tab.1): *Accipitriformes*, *Strigiformes*, *Anseriformes*, *Caradriformes*, *Procellariiformes*, *Podicipediformes*, *Pelecaniformes* *Ciconiiformes*.

Numero soggetti campionati	Specie	Nome latino
31	Poiana	<i>Buteo buteo</i>
18	Grillaio	<i>Falco naumanni</i>
5	Gheppio	<i>Falco tinnunculus</i>
4	Nibbio bruno	<i>Milvus migrans</i>
3	Falco Pecchiaiolo	<i>Pernis apivorus</i>
2	Biancone	<i>Circaetus gallicus</i>
2	Aquila Reale	<i>Aquila chrysaetos</i>
1	Falco di Palude	<i>Circus aeruginosus</i>
3	Sparviere	<i>Accipiter nisus</i>
1	Nibbio reale	<i>Milvus milvus</i>
1	Astore	<i>Accipiter gentilis</i>
4	Falco pellegrino	<i>Falco peregrinus</i>
1	Poiana codabianca	<i>Buteo rufinus</i>
1	Albanella minore	<i>Ciucus pygargus</i>
1	Grifone	<i>Gyps fulvus</i>
2	Civetta	<i>Athene noctua</i>
1	Falco sacro	<i>Falco cherrug</i>
1	Falco lanario	<i>Falco biarmicus</i>
5	Gufo reale	<i>Bubo bubo</i>
6	Barbagianni	<i>Tyto alba</i>
7	Gufo comune	<i>Asio otus</i>
13	Gabbiano reale	<i>Larus michahellis</i>
1	Gabbiano comune	<i>Chroicocephalus ridibundus</i>
1	Berta minore	<i>Puffinus yelkouan</i>
1	Svasso maggiore	<i>Podiceps cristatus</i>
1	Airone guardabuoi	<i>Bubulcus ibis</i>
1	Tarabuso	<i>Botaurus stellaris</i>
1	Cigno	<i>Cygnus olor</i>
1	Germano reale	<i>Anas platyrhynchos</i>

Tabella 1. Numero e specie di volatili sottoposti a monitoraggio presso il centro di recupero.

I campionamenti sono stati effettuati nell'ambito del monitoraggio clinico svolto di routine sugli uccelli presenti nella struttura e indirizzato a verificare l'eventuale circolazione di malattie infettive e diffusive nel Centro di Recupero. La ricerca ha interessato, in particolare, esemplari con degenze prolungate ma che alla visita clinica risultavano apparentemente sani. Il sangue, prelevato dalla vena ulnare, è stato raccolto in provette da siero con attivatore e gel separatore, successivamente refrigerate e sottoposte a centrifugazione per 15 minuti a 1500 giri per favorire la separazione delle componenti ematiche. I sieri così ottenuti sono stati posti in provette Eppendorf e stoccati a -18 C° fino al momento dell'uso.

La ricerca degli anticorpi per la Pseudopeste aviaria è stata condotta mediante il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione utilizzando 4 unità emoagglutinanti di NDV, secondo le linee guida dell'allegato al DPR 92/66/CEE. L'antigene virale (ceppo di virus NDV Ulster 2c) e sieri, positivo e negativo di riferimento, sono stati forniti dal Centro di Referenza Nazionale per l'influenza aviaria e la Malattia di Newcastle presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Padova. Sono stati considerati positivi i soggetti con $-\log_2(\text{titolo}) > 3$.

Ricerca del Virus della Malattia di Newcastle

È stata effettuata mediante RT-PCR a partire da 35 colli di pollo destinati all'alimentazione dei rapaci, raccolti casualmente dalle scatole al momento dell'arrivo in Osservatorio.

In particolare, i campioni sono stati raggruppati in 7 pool da 5 colli ciascuno.

I colli erano forniti da un'azienda specializzata nella fornitura di mangimi per animali esotici, rapaci e non convenzionali.

La ricerca dell'RNA virale è stata effettuata a partire da tamponi RNAsi free, passati più volte sulla superficie dei colli dopo essere stati imbevuti in una soluzione fisiologica sterile. I tamponi sono stati riuniti in provetta in pool da 5.

L'estrazione di RNA è stata effettuata utilizzando il kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Milano, Italia) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. L'amplificazione del frammento specifico di RNA virale è stata condotta mediante RT-PCR (Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction) utilizzando la metodica descritta da Stauber et al. [15].

Dai campioni risultati positivi, la banda sospetta è stata tagliata dal gel di agarosio ed è stata sottoposta ad eluizione utilizzando il kit PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen by life technologies) seguendo le indicazioni del fornitore.

Il prodotto è stato quindi sottoposto a clonaggio e successivamente sequenziato presso BMR Genomics s.r.l. (Padova, Italia).

Analisi delle sequenze

L'analisi nucleotidica e amminoacidica relativa alle sequenze ottenute è stata condotta con l'ausilio dell'applicazione CLC Sequence Viewer (CLC Bio, Aarhus, Danimarca).

Le sequenze nucleotidiche ed amminoacidiche sono state confrontate con quelle presenti in GenBank mediante software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). In particolare, sono stati usati gli algoritmi BlastN e BlastP per confrontare rispettivamente la sequenza nucleotidica e le sequenze amminoacidiche con quelle depositate in banca dati.

Analisi filogenetiche

La sequenza nucleotidica dell'amplicone relativa al caso in esame è stata confrontata con quella corrispondente relativa ad altri 53 stipiti virali depositati in GenBank. Il multiallineamento, allestito sulla base dell'algoritmo ClustalW, è stato elaborato mediante software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v 7. Sulla base del multiallineamento è stato allestito un albero filogenetico con metodo Neighbor-Joining, secondo il modello di Jukes-Cantor, ed effettuando il test di bootstrap su 1000 replicati. Lo stesso procedimento è stato utilizzato per l'analisi filogenetica relativa alla corrispondente sequenza amminoacidica, con la differenza che le distanze sono state calcolate secondo il modello Poisson.

Ethical Statement

Il progetto di ricerca è stato sottoposto e valutato dal comitato etico del Dipartimento di Medicina Veterinaria che ha espresso parere favorevole alla sua esecuzione. Approval number n. 20/2018

RISULTATI

Indagini sierologiche

In totale, 20 dei 120 volatili (16,66%) esaminati ha presentato un titolo uguale o superiore a 4 log₂, mentre altri 11 soggetti avevano un titolo pari a 3 log₂.

Tra gli acquatici solo un cigno reale, ospitato nel centro da molti anni come animale ornamentale, è risultato positivo; più alta la percentuale di soggetti con anticorpi tra i rapaci, sia diurni che, soprattutto, notturni (Tab.2).

	Campioni esaminati		Positivi	
		n		%
Rapaci Diurni	80	14		17,50
Rapaci Notturni	20	5		25,00
Acquatici	20	1		5,00

Tabella 2. Distribuzione delle positività sierologiche a A-PMV1 tra i volatili sottoposti a monitoraggio.

I titoli riscontrati erano compresi tra 4 e 8 log₂, con una media di 5,5 ed una moda di 5. I titoli maggiori erano osservabili in un biancone, una poiana, nell'astore e nei gufi reali (Tab.3).

Specie	Soggetti esaminati	Titoli	
		n (titolo log ₂)	% di positività
Poiana	31	6 (4, 5, 5, 5,5,7)	19,35
Grillaio	18	2 (5,5)	11,11
Gheppio	11	1 (4)	9,00
Nibbio bruno	4	0	-
Nibbio reale	1	0	-
Falco pecchiaiolo	3	0	-
Falco lanario	1	0	-
Poiana codabianca	1	0	-
Grifone	1	0	-
Albanella minore	1	0	-
Biancone	2	1 (7)	50
Aquila Reale	2	1 (4)	50
Falco di Palude	1	1 (5)	100
Sparviere	3	0	-
Astore	1	1 (8)	100
Falco pellegrino	4	0	-
Falco sacro	1	1 (5)	100
Gufo reale	5	5 (4, 6, 7, 7, 8)	100
Barbagianni	6	0	-
Civetta	2	0	-
Gufo comune	7	0	-
Gabbiano reale	13	0	-
Gabbiano comune	1	0	-
Berta minore	1	0	-
Airone guardabuoi	1	0	-
Svasso maggiore	1	0	-
Tarabuso	1	0	-
Cigno	1	1 (5)	100
Germano reale	1	0	-

Tabella 3. Distribuzione delle positività sierologiche a A-PMV1 tra le diverse specie di fauna selvatica sottoposte a monitoraggio.

Esame virologico mediante RT-PCR da campioni di carne destinata all'alimentazione dei rapaci

Tutti i colli di pollo testati esibivano, all'elettroforesi dell'amplificato, la banda attesa di 310 pb (Fig.1).



Figura 1. Risultato della RT-PCR effettuata su campioni di colli di pollo per la ricerca del virus A-PMV1. A, B: colli di pollo; C: controllo positivo; M: Marker; D: controllo negativo.

Il successivo sequenziamento ha confermato la positività per APMV-1. All'amplificato virale è stata attribuita la sigla BA_2018.375.

La sequenza amminoacidica, estrapolata a partire dalla sequenza nucleotidica dopo confronto con le sequenze depositate in GenBank, dimostrava, per tutti e tre i campioni, un'elevata identità con una porzione polipeptidica della proteina di fusione del virus APMV-1.

Inoltre, poiché la sequenza dell'amplicone clonato, comprendeva il sito di clivaggio del precursore F0 della proteina di fusione è stato possibile accertare la patogenicità dei virus evidenziati. Nel caso di BA-2018.375, la sequenza del sito di clivaggio era ¹¹²GKQGR*L¹¹⁷ (l'asterisco indica il punto di taglio), tipica dei virus a bassa patogenicità. Il sito di clivaggio, inoltre era perfettamente corrispondente a quella del ceppo vaccinale PHY LMV42 [16] (Fig.2).

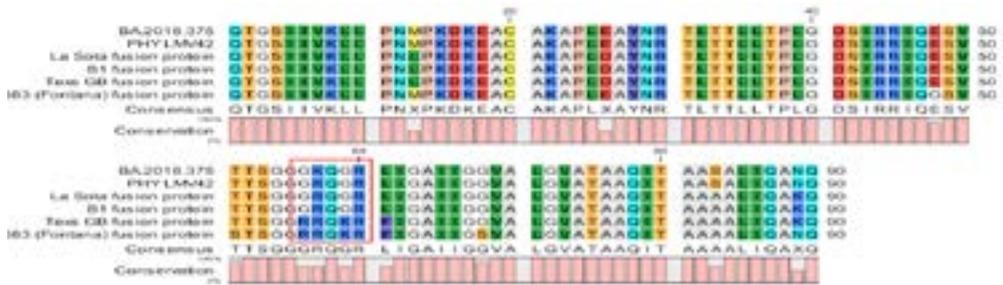


Figura 2. Allineamento del frammento amplificato relativo a BA-2018.375 con alcune sequenze di virus a bassa ed alta patogenicità presenti in GenBank.

Le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle riportate in letteratura e depositate in GenBank. Per lo studio filogenetico, le sequenze amminoacidiche sono state multiallineate, e la distanza tra loro calcolata utilizzando la correzione di Poisson. L'albero filogenetico corrispondente è stato costruito utilizzando il metodo Neighbor Joining con test di bootstrap su 500 replicati. L'albero filogenetico ottenuto è mostrato in Fig. 3.

Il ceppo isolato BA-2018 risulta pienamente correlato al ceppo vaccinale PHY-L-MV42 (percentuale di identità del 100%).

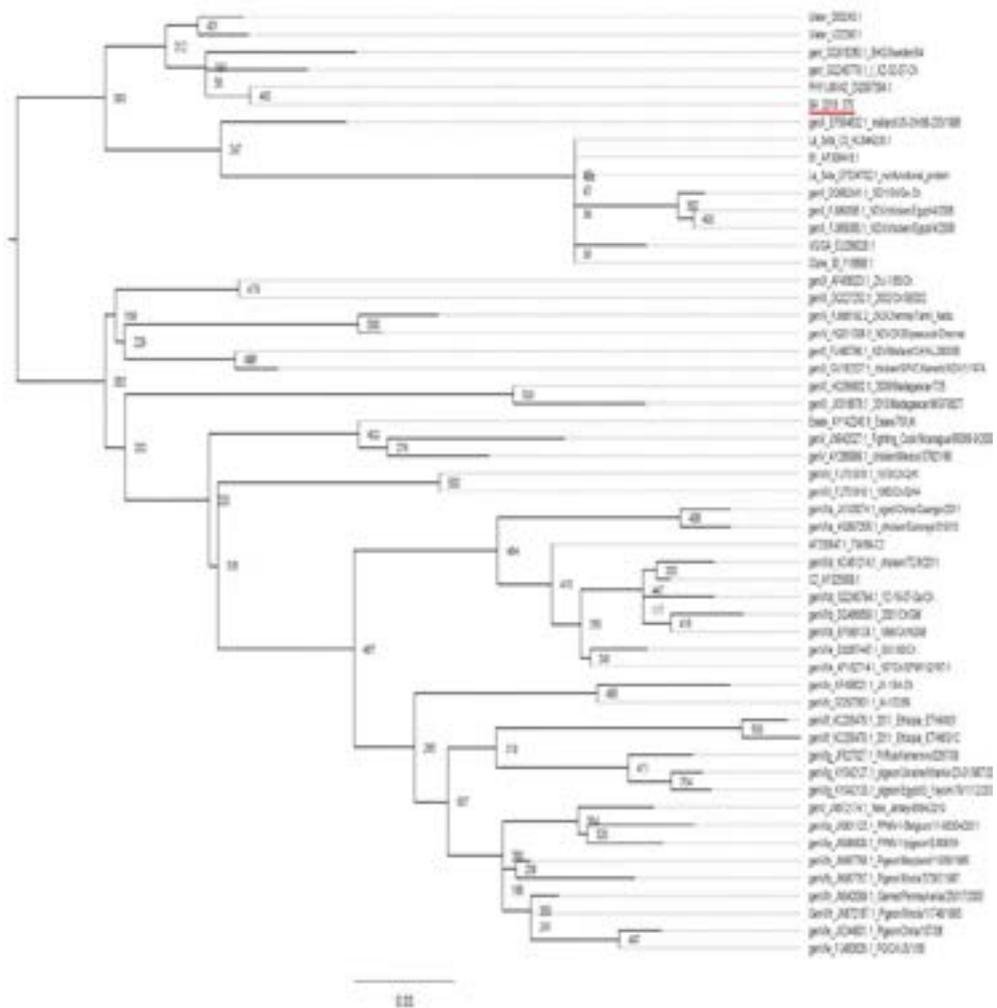


Figura 3. Albero filogenetico costruito sulla base del confronto delle sequenze aminoacidiche

DISCUSSIONE

Il monitoraggio sierologico effettuato su larga scala negli animali del Centro di Recupero ha evidenziato positività compatibili con una circolazione del virus della Pseudopeste aviare all'interno della struttura. L'assenza di sintomatologia, in ogni caso, ha portato a ipotizzare che l'infezione sia da attribuire a un ceppo a bassa patogenicità.

Gli uccelli che hanno manifestato sieroconversione erano quasi esclusivamente i rapaci, sia diurni che notturni. Gli acquatici, infatti, sono risultati costantemente negativi ad eccezione di un cigno lungodegente, che viveva da almeno dieci anni libero in un laghetto. In natura, gli anatidi mostrano una bassa prevalenza dell'infezione

[17], con percentuali di positività che variano dallo 0,5 al 2%. Essi sono considerati serbatoio per patotipi di APMV-1 a bassa virulenza o di ceppi apatogeni enterici. L'intestino di questi animali costituisce un perfetto ambiente per la ricombinazione virale che, in alcuni, casi può esitare con la comparsa di ceppi ad elevata patogenicità [18,19]. È possibile che il cigno abbia avuto contatti con altre specie libere in natura che utilizzano il laghetto per il passo e che da esse abbia potuto acquisire il virus che ha determinato la sierconversione.

Nella nostra indagine la maggior percentuale di positività era presente nei rapaci notturni e, tra questi, nel gufo reale. Tutti gli esemplari di questa specie presentavano anticorpi specifici nei confronti del virus. Questi volatili in cattività possono superare i 60 anni di vita, mentre allo stato selvatico si ritiene che questa aspettativa si posizioni sui 20 anni circa [20,21]. I gufi reali sottoposti a monitoraggio erano ricoverati da molti anni, alcuni da oltre 20. Durante la loro lunga vita questi uccelli hanno probabilmente maggiore probabilità di venire a contatto con i virus pseudopestosi e contrarre l'infezione. Il gufo reale sembrerebbe, inoltre, essere in grado di sierconvertire facilmente ma, allo stesso tempo, non sarebbe incline a manifestare la sintomatologia clinica. Esso può eliminare il virus fino a 4 mesi post-infezione [22]. Segnalazioni di soggetti con positività virologica sono state fatte in questa specie in passato [23,24], in Europa e a Taiwan [25].

I titoli riscontrati nel monitoraggio descritto in questo lavoro risultano, nel gufo, relativamente elevati a conferma di una infezione abbastanza recente. Vi è da segnalare tuttavia il fatto che in questa specie gli anticorpi neutralizzanti anti-APMV-1 possono essere rilevati in circolo fino ad un anno post-infezione [22].

Titoli simili a quelli del gufo reale sono stati riscontrati in un biancone e nelle poiane lungodegenti, ricoverati da alcuni anni presso il Centro di Recupero. Alcune delle poiane positive, inoltre, condividevano la stessa voliera. La circolazione dei virus pseudopestosi in natura è un fenomeno noto [7]. La fonte dell'infezione è spesso alimentare, e da ricondurre soprattutto al consumo di piccoli uccelli [26], i quali si pensa possano fungere da vettori meccanici dei virus vaccinali, specie quando vivono in prossimità di allevamenti avicoli intensivi. Per falchi di medie o grandi dimensioni una fonte importante di infezione può essere rappresentata dai colombi (*Columba livia*), dalle quaglie (*Coturnix japonica*) e, più raramente, dai polli infetti [27,28,29]. È per questo motivo che i virus presenti nei predatori sono spesso strettamente correlati con quelli che infettano le loro prede [24].

Nelle indagini effettuate, la percentuale media di positività riscontrata appariva più elevata rispetto a quella riscontrata in analoghe ricerche effettuate su soggetti liberi. A queste si aggiungevano numerosi campioni che presentavano un titolo di 3 log₂ che, sebbene considerato negativo nell'ambito di screening epidemiologici nel pollo, non esclude completamente contatti pregressi col virus. Queste osservazioni hanno portato ad approfondire le indagini al fine di verificare se la diffusa sierconversione, in assenza di sintomatologia clinica, fosse da associare a una fonte comune di infezione.

I test genetici effettuati hanno chiaramente individuato nei colli di pollo la fonte principale del virus. Tutti i campioni testati, infatti, sono risultati positivi in PCR nei confronti di un ceppo di APMV-1. Lo studio genetico del sito di clivaggio nelle posizioni comprese tra la 113 e 117 ha consentito, inoltre, di accertare che si trattava di un virus a bassa virulenza. Questo virus, pertanto, non può essere considerato un pericolo per la salute dei volatili ricoverati.

È noto che le condizioni di stress portano i Paramyxovirus, al pari degli Orthomyxovirus [30,31,32] a replicare con maggiore facilità nell'organismo. Questo può indurre, da un lato, una più significativa eliminazione del virus e dall'altro una maggiore probabilità che esso muti a livello del sito di clivaggio, con una inversione della patogenicità del ceppo. Si ipotizza, infatti, che sia stata proprio la sostituzione di uno o due aminoacidi nel sito di clivaggio a dare origine, in Australia e Irlanda, a ceppi patogeni ad elevata diffusione [33,34,35].

Bisogna inoltre considerare che, anche se a bassa virulenza, alcuni stipiti virali mantengono un potere patogeno residuo. Ne sono prova gli studi effettuati calcolando l'indice di patogenicità di ceppi vaccinali di pseudopeste aviaria utilizzati come vaccini che hanno accertato, ad esempio, che il ceppo Lasota, capostipite dei virus vaccinali della Pseudopeste, ha un ICPI pari a 0,4. Non può essere escluso, pertanto, che vaccini allestiti con ceppi che presentano una patogenicità residua possano facilitare l'insorgenza di infezioni secondarie soprattutto all'albero respiratorio [22] che possono condurre a morte gli animali.

Le indagini filogenetiche effettuate sulla porzione di gene della proteina F hanno consentito di accertare che il virus responsabile della sierconversione era di origine vaccinale. Si trattava, infatti, del ceppo PHY-LMV42, a bassa virulenza, naturalmente apatogeno, di tipo enterico, impiegato per l'allestimento di un vaccino vivo utilizzato in Italia e in molti paesi europei ed extraeuropei.

La vaccinazione con virus vivo attenuato è utilizzata di routine nell'industria avicola. I pulcini, infatti, vengono immunizzati già a un giorno di vita per via spray e poi, a volte, se ritenuto necessario, sottoposti ad un richiamo se destinati alla produzione di carne, o nel caso delle galline ovaiole anche a 2 richiami nella fase di pollastra.

Il virus potrebbe, pertanto, persistere nell'ambiente e negli animali, e questo potrebbe facilitare la contaminazione delle carcasse durante la macellazione. Il mantenimento della catena del freddo favorirebbe la sopravvivenza del virus [36]. I rapaci del centro di recupero si sarebbero infettati, pertanto, mangiando questi alimenti.

Ulteriori studi sono necessari per chiarire se il virus possa effettivamente sopravvivere negli alimenti destinati ai rapaci per confermare il rapporto di causa effetto tra assunzione dell'alimento e sierconversione e verificare se gli uccelli, una volta infetti, eliminino il virus nell'ambiente innescando la catena epidemiologica di diffusione e trasmissione dello stesso. Ovviamente l'assoluta apatogenicità e stabilità del ceppo virale riscontrato nelle presenti indagini rende pressochè nullo il rischio per gli animali. Questi dati sono comunque importanti in quanto forniscono indicazioni, sia pure indirette, dell'importanza che l'alimentazione può avere nel facilitare la circolazione di virus in natura e nei centri di recupero tra le popolazioni di fauna selvatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Kaleta, E. F., & Baldauf, C. (1988). *Newcastle Disease in Free-Living and Pet Birds*, 197–246.
2. Alexander, D. J., Aldous, E. W., & Fuller, C. M. (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology* 41(4), 329–335.
3. Choi, K. S., Kye, S. J., Kim, J. Y., To, T. L., Nguyen, D. T., Lee, Y. J., Choi, J. G., Kang, H. M., Kim, K. Il, Song, B. M., & Lee, H. S. (2014). Molecular epi-

- miology of Newcastle disease viruses in Vietnam. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1), 271–277.
4. Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453.
 5. Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 19(2), 443–462.
 6. Rahman, A., Habib, M., & Shabbir, M. Z. (2018). Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Feral Birds and their Potential Role in Interspecies Transmission. *The Open Virology Journal*, 12(1), 52–68.
 7. Suarez DL, Miller PJ, Koch G, Mundt E, Rautenschlein S (2019). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougals LR, Nair V, Suarez DL, de Wit S, Grimes T, Johnson D, Kromm M, Prajitno TY, Rubinoff I and Zavala G (Eds), *Diseases of Poultry 14th Edition*, John Wiley & Sons, Hoboken, US. pp. 109-166.
 8. Welch, C. N., Shittu, I., Abolnik, C., Solomon, P., Dimitrov, K. M., Taylor, T. L., Williams-Coplin, D., Goraichuk, I. V., Meseko, C. A., Ibu, J. O., Gado, D. A., Joannis, T. M., & Afonso, C. L. (2019). Genomic comparison of Newcastle disease viruses isolated in Nigeria between 2002 and 2015 reveals circulation of highly diverse genotypes and spillover into wild birds. *Archives of Virology*, 164(8), 2031–2047.
 9. Miguel, E., Grosbois, V., Berthouly-Salazar, C., Caron, A., Cappelle, J., & Roger, F. (2013). A meta-analysis of observational epidemiological studies of Newcastle disease in African agro-systems, 1980-2009. *Epidemiology and Infection*, 141(6), 1117–1133.
 10. Ayala, A. J., Dimitrov, K. M., Becker, C. R., Goraichuk, I. V., Arns, C. W., Bolotin, V. I., Ferreira, H. L., Gerilovych, A. P., Goujgoulova, G. V., Martini, M. C., Muzyka, D. V., Orsi, M. A., Scagion, G. P., Silva, R. K., Solodiankin, O. S., Stegnyy, B. T., Miller, P. J., & Afonso, C. L. (2016). Presence of vaccine-derived newcastle disease viruses in wild birds. *PLOS ONE*, 11(9), 1–19.
 11. Rahmahani, J., Nikmatuz Zahro, A., Rahmawati, I. L., Putih, N., Wulandari, I., & Abdul-Rantam, F. (2020). Nucleotide mutation analyses of isolated lentogenic newcastle disease virus in live bird market. *Molecular Biology Research Communications*, 9(4), 181–188.
 12. Gould, A. R., Hansson, E., Selleck, K., Kattenbelt, J. A., Mackenzie, M., & Della-Porta, A. J. (2010). Newcastle disease virus fusion and haemagglutinin-neuraminidase gene motifs as markers for viral lineage. *Avian Pathology*, 32(4), 361-373.
 13. Jindal, N., Chander, Y., Primus, A., Redig, P. T., & Goyal, S. M. (2010). Isolation and molecular characterization of Newcastle disease viruses from raptors. *Avian Pathology*, 39(6), 441–445.
 14. Francksen, R. M., Whittingham, M. J., Ludwig, S. C., Roos, S., & Baines, D. (2017). Numerical and functional responses of Common Buzzards (*Buteo buteo*) to prey abundance on a Scottish grouse moor. *Ibis*, 159(3), 541–553.
 15. Stäuber, N., Brechtbühl, K., Bruckner, L., Hofmann, M.A. (1995). Detection of

- Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine*, Vol.13, No.4, 360-364.
16. Czeplédi, A., Ujvári, D., Somogyi, E., Wehmann, E., Werner, O., & Lomniczi, B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Research*, 120(1–2), 36–48.
 17. Wobeser, G.A. (1997). “Avian Influenza, Newcastle Disease, and Other Paramyxoviruses. In: G. A. Wobeser (Ed.), *Diseases of Wild Waterfowl* (2nd Edn, Pp. 29±41). New York: Plenum Press.” pag. 29-41.
 18. Lancaster, J.E. (1966). “Newcastle Disease,” 1926–64. Monograph No. 3. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Ontario. Cit. da Lancaster, J. E. (1981). Newcastle Disease—Pathogenesis and Diagnosis. *World's Poultry Science Journal*, 37(1), 26-33. doi:10.1079/WPS19810003
 19. Westbury, H. (2001). “Commentary. Newcastle Disease Virus: An Evolving Pathogen.” *Avian Pathology*, 5–11.
 20. König, C., Weick, F. (2008). “*Owls of the World (2nd ed)*”. London: Christopher Helm pag. 1-508.
 21. Mikkola, H. (2012). “*Owls of the World: A Photographic Guide*”. Firefly Books. Pag. 1-528
 22. Catelli, E. (2009). Infezioni da Paramyxoviridae. In G. Asdrubali & A. Fioretti (Eds.), *Manuale di Patologia Aviaria* pag. 137–153.
 23. Schoop, G., Siegert, R., Galassi, D. and Kloppel, G. (1955). “Newcastle-Infektionen Beim Steinkaug (Athene Noctua), Hornraben (Bucorvus Sp.), Seadler (Haliaetus Albicilla) Und Rieseneisvogel (Dacelo Gigas).” *Monatshefte Für Tierheilkunde Stuttgart* 7, 223-235.
 24. Jindal, Naresh, Yogesh Chander, Alexander Primus, Patrick T Redig, and Sagar M Goyal. (2010). “Isolation and Molecular Characterization of Newcastle Disease Viruses from Raptors.” *Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A* 39 (6): 441–45.
 25. Kou, Y.T., Chueh, L.L. & Wang, C.H. (1999). “Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the F Gene of Newcastle Disease Viruses Isolated from Chickens and an Owl in Taiwan.” *Journal of Veterinary and Medical Science* 61, Iss. 11, 1-5.
 26. Stalmaster, M.V. (1987). “The Bald Eagle.” *New York: Universe Co., Publishing*; pag. 1-10.
 27. Samour J. (2005). “Management of Raptors. In: Harrison GJ, Lightfoot TL, Eds. *Clinical Avian Medicine*. Vol II. Lake Worth, FL: Spix Publishing; 2005:915–956.”
 28. Stanford M. (2008). “Raptors: Infectious Diseases. In: Chitty J, Lierz M, Eds. *BSAVA Manual of Raptors, Pigeons and Passerine Birds*. Quedgeley, UK: British Small Animal Veterinary Association;” pag 212-222
 29. Wernery U, Alexander DJ, Neumann U, et al. (1995). “Newcastle Disease in Captive Falcons.” In *Proc Middle East Falcon Res Group Spec Workshop*, 24–39.
 30. De Marco, M. A., Campitelli, L., Foni, E., Raffini, E., Barigazzi, G., Delogu, M., Guberti, V., Di Trani, L., Tollis, M., & Donatelli, L. (2004). Influenza surveillance in birds in Italian wetlands (1992–1998): is there a host restricted circula-

- tion of influenza viruses in sympatric ducks and coots? *Veterinary Microbiology*, 98(3–4), 197–208.
31. De Marco, M. A., Foni, G. E., Campitelli, L., Raffini, E., Di Trani, L., Delogu, M., Guberti, V., Barigazzi, G., & Donatelli, I. (2003). Circulation of influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. *Avian Diseases*, 47(3), 861–866.
 32. Delogu, M. (2009). Infezioni da Orthomyxovirus. In G. Asdrubali & A. Fioretti (Eds.), *Manuale di Patologia Aviaria* pag. 155–173.
 33. Alexander, D. J. (1997). Newcastle Disease and Other Paramyxoviridae Infections. In S. K. Samal (Ed.), *Disease of Poultry* 10th ed., pag 541–569.
 34. Collins, M. S., Franklin, S., Strong, I., Meulemans, G., & Alexander, D. J. (1998). Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 27(1), 90–96.
 35. Gould, A. R., Kattenbelt, J. A., Selleck, P., Hansson, E., Della-Porta, A., & Westbury, H. A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Research*, 77(1), 51–60.
 36. OIE. Newcastle disease (avian paramyxovirus serotype 1). Aetiology, epidemiology, diagnosis, prevention and control. Potential impacts of disease agent beyond clinical illness references. <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/newcastle-disease-virus-wild-birdsinfection-with.pdf>. Ultimo accesso 23.09.2021.