

## COMUNICAZIONE 28

### EVIDENZA DI PNEUMOVIRUS AVIARE SOTTOTIPO A IN CORSO DI UN FOCOLAIO DI TRT IN TACCHINI DA CARNE IN ITALIA

M. Cecchinato<sup>1</sup>, E. Catelli<sup>1</sup>, C.E. Savage<sup>2</sup>, P. De Matteo<sup>1</sup>, M. Faenzi<sup>3</sup>, C.J. Naylor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bologna - Ozzano Emilia (BO) - Italia; <sup>2</sup>Department of Veterinary Pathology - University of Liverpool (UK); <sup>3</sup>Gruppo Amadori - S. Vittore (FC) - Italia.

Parole chiave: Rinotracheite del tacchino, TRT, Pneumovirus aviare sottotipo A, Tacchino da carne, Nested RT-PCR

#### Detection of avian pneumovirus subtype A during an outbreak of TRT in meat turkeys in Italy

Key words: Turkey rhinotracheitis, TRT, Avian Pneumovirus subtype A, Meat turkey, Nested RT-PCR

Summary: An outbreak of Turkey rhinotracheitis caused by an Avian pneumovirus (APV) subtype A is described in one Italian meat turkey farm. The flocks were sited in Perugia province. Virus isolation was performed in chicken tracheal organ cultures and the strain was typed by a subtype specific nested RT-PCR. This is the first evidence that APV subtype A is present in Italy.

Correspondence: Mattia Cecchinato - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria – Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 Ozzano Emilia (BO). Email mcecchinato@vet.unibo.it

#### Introduzione

Il Pneumovirus Aviare (APV) è un virus ad RNA appartenente alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al nuovo genere *Metapneumovirus*. E' causa nel tacchino di una infezione delle prime vie respiratorie nota come Rinotracheite del Tacchino (TRT), mentre nel pollo è responsabile di una forma respiratoria lieve, a volte inapparente, che può sfociare nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di APV, distinti variamente fra loro sia dal punto di vista genetico che sierologico. I sottotipi A e B, diffusi in Europa sin dalla prima comparsa della malattia, differiscono sulla base della sequenza nucleotidica del gene G che codifica per la omonima glicoproteina di superficie (7). Il sottotipo C, che è stato segnalato più recentemente negli Stati Uniti d'America, ha invece differenze genomiche e sierologiche più evidenti rispetto ai precedenti (9); come anche il sottotipo D che comprende per ora unicamente 2 ceppi isolati in Francia nel 1985 (1). La tipizzazione molecolare eseguita sui primi isolati italiani provenienti da allevamenti di tacchini del Nord Italia, ha dimostrato la presenza nel nostro Paese del sottotipo B (7; Sperati Ruffoni L., comunicazione personale), e la diffusione dello stesso sottotipo in provincia di Verona è stata recentemente confermata sia nel pollo che nel tacchino (2; 3). I dati disponibili sono quindi sino ad ora relativi ad un'area geografica limitata e quindi insufficienti a definire un quadro completo dell'epidemiologia dell'infezione da APV in Italia. Allo scopo di ottenere ulteriori preziose informazioni sulla diffusione della malattia e l'eventuale presenza di altri sottotipi di APV abbiamo ampliato l'indagine virologica e molecolare a regioni del centro Italia.

Con la presente comunicazione riportiamo l'isolamento virale di un ceppo di APV sottotipo A, in corso di un focolaio di TRT in tacchini da carne in provincia di Perugia.

#### Materiali e Metodi

##### Allevamento

Il focolaio di TRT oggetto dello studio si è verificato in un allevamento di tacchini da carne localizzato in provincia di Perugia, appartenente ad una grossa azienda avicola italiana.

I gruppi di tacchini sono stati vaccinati nei riguardi della TRT per via oculo-nasale a 7 giorni di età con un vaccino vivo attenuato del sottotipo B. In allevamento

erano presenti 4 gruppi di tacchini maschi, di consistenza variabile dai 4000 ai 5000 soggetti per gruppo. Essi hanno mostrato i primi sintomi respiratori, caratterizzati da starnuti, scolo nasale ed oculare, e difficoltà respiratoria a circa 45 giorni di età. La forma respiratoria, che è stata in alcuni casi complicata da infezioni secondarie, ha gradualmente interessato tutti i gruppi causando una mortalità totale del 10-11%.

##### Campionamento

Il campionamento è stato eseguito in 2 capannoni (numero 3 e 4). Per ciascun gruppo sono stati scelti 10 tacchini con forma respiratoria iniziale per aumentare la probabilità dell'isolamento virale. Da ciascun animale sono stati raccolti contemporaneamente due tamponi rinofaringei, destinati rispettivamente alla nested RT-PCR ed all'isolamento virale. I tamponi destinati alla RT-PCR sono stati asciugati all'aria per 30 minuti e conservati a temperatura ambiente sino alla processazione. Quelli destinati allo isolamento virale sono stati immediatamente immersi in terreno di trasporto e tenuti a temperatura di ghiaccio fondente sino al momento della preparazione dell'inoculo, che è stata eseguita all'arrivo in laboratorio. I tamponi sono stati processati in pool di 10 ed i campioni accettati come riportato in tabella 1:

Tabella 1: Campioni esaminati

Table 1: *exained samples*

Capannone	Isolamento virale	Nested RT-PCR
3	259-01/03	259-02/03
4	259-03/03	259-04/03

##### Nested RT-PCR

Per evidenziare e tipizzare APV dai tamponi a secco, e confermarne l'isolamento virale, è stata impiegata una nested RT-PCR, basata sulla sequenza del gene G ed in grado di differenziare i sottotipi A e B. L'estrazione dell'RNA dai tamponi a secco e la retrotrascrizione sono state eseguite secondo il metodo descritto da Cavanagh *et al.* (1999) (4). L'RNA virale dal terreno colturale è stato estratto utilizzando un kit del commercio (QIAamp viral Mini Kit, Qiagen). La nested PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Naylor *et al.* (1997) (8). La PCR interna utilizzava un primer antisense (G5-) comune ad ambedue i sottotipi, e 2 primer senso, uno per il sottotipo A (G8+A) in grado di generare un cDNA di

268bp e l'altro specifico per il sottotipo B (G9+B) in grado di generare un cDNA di 361bp. Il prodotto della amplificazione, dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio, è stato visualizzato mediante colorazione con bromuro di etidio.

#### Isolamento virale

L'isolamento virale è stato eseguito sui campioni positivi alla RT-PCR. Come substrato sono state utilizzate colture di anelli tracheali di embrione di pollo, preparate a partire da embrioni di pollo SPF al 18-20° giorno di incubazione (5). Le colture erano ritenute positive se si osservava ciliostasi entro 10 giorni dalla inoculazione. La conferma dell'isolamento di APV era ottenuta mediante RT-PCR.

#### Risultati

I campioni 259-01/03 e 259-02/03, eseguiti nel capannone 3 sono risultati positivi per APV sottotipo A rispettivamente all'isolamento virale ed alla nested RT-PCR (Figura 1). Sono risultati negativi i campioni eseguiti nel capannone 4.

#### Discussione

I nostri risultati mostrano per la prima volta la presenza di Pneumovirus aviare sottotipo A (APV-A) in Italia, dove sino ad ora era stato evidenziato il sottotipo B (APV-B) (7;2). Per diversi anni si è creduto che APV-A fosse presente in Gran Bretagna e in Sud Africa e che il B circolasse solo in Europa continentale. Studi più recenti, invece, hanno dimostrato la comparsa di quest'ultimo nel Regno Unito (8) e la presenza di APV-A in Europa continentale già alla fine degli anni '80 (6). Difficile è definire se il sottotipo A in Italia sia una nuova introduzione o se già da tempo circolasse nei nostri allevamenti: il focolaio riportato, infatti, si è verificato in un'area geografica da cui non risultano precedenti segnalazioni di isolamenti e tipizzazioni molecolari di APV. Ulteriori indagini sono necessarie a completare il quadro epidemiologico italiano che appare al momento frammentario.

L'osservazione di un focolaio di TRT in soggetti vaccinati si somma alle frequenti osservazioni di campo di rotture vaccinali imputate alternativamente ai metodi e ai piani vaccinali piuttosto che alla possibile reversione del vaccino o alla non completa cross protezione fra i sottotipi A e B. Anche se i dati sperimentali relativi a questo ultimo aspetto mostrano come ci sia una ottima protezione fra ceppi omologhi e buona fra eterologhi (8;10), le contrastanti osservazioni di campo richiedono ulteriori approfondimenti.

#### Bibliografia

1. Bayon-Auboyer M.H., Jestin V., Toquin D., Cherbonnel M., Etteradossi N. (1999). "Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus". Archives of Virology, 144, 1091-1109.
2. Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Marco M.A., Ortali G., Franciosi C., Naylor C.J. (2003). "Avian pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey". Abstract XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association, July 19-23, 2003, Denver-Colorado (USA). Abstract n.92, p.154.
3. Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Matteo P., DeMarco M.A., Ortali G., Pesente P., Sarti L., Franciosi C. (2002). "Infezione da pneumovirus aviare nel tacchino da carne e nel broiler: indagini di campo". Large Animals Review, 8 (6),109-110.

4. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. (1999). "Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type-specific Polymerase chain reactions". Avian Pathology, 28, 593-605.
5. Cook, J.K.A., Darbyshire J.H., Peter R.W. (1976). "The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus ". Archives of Virology, 50, 109-118.
6. Hafez H.M., Hess M., Prusas C., Naylor C.J., Cavanagh D. (2000). "Presence of Avian Pneumovirus Type A in Continental Europe During the 1980s". Journal Veterinary Medicine B, 47, 629-663.
7. Juhasz K., Easton A.J. (1994). "Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups". Journal of General Virology, 75, 2873-2880.
8. Naylor C.J., Shaw K., Brown P., Cavanagh D. (1997). "Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain". Avian Pathology, 26, 327-338.
9. Seal B.S. (1998). "Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first U.S. avian pneumovirus isolate is distinct from European subtypes". Virus Research, 58, 45-52.
10. Van de Zande S., Nauwynck H., Naylor C.J., Pensaert M., (2000) "Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys". Veterinary Record, 147, 132-134.

Figura 1: Elettroforesi in gel di agarosio. DNA Marker (lane 1) e DNA prodotto della nested RT-PCR per APV del campione 259-02/03 (lane 2). L'amplificato è di circa 300 bp.

Figure 1: Agarose gel electrophoresis. DNA size marker (lane 1) and DNA product obtained after Nested RT-PCR for APV with sample 259-01/03 (lane 2). The DNA product is about 300 bases in length.

