

EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI MAREK IN ITALIA NEL 2014-2016

Mescolini G.¹, Lupini C.¹, Bellinati L.¹, Felice V.¹, Listorti V.¹, Massi P.², Tosi G.², Rossi G.³, Pesente P.³, Cecchinato M.⁴, 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 Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5, 37132, San Michele Extra (VR), Italia

⁴ Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova, Agripolis Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD) - Italia.

Summary

Eighteen Marek's disease virus (MDV-1) strains collected from clinical cases of Marek's disease occurred from 2014 to 2016 in Italian commercial and backyard chicken flocks, were analyzed. Viruses were detected by a PCR protocol targeting the *meq* gene from feathers, spleen or tumor samples of birds affected by classical nervous or acute forms. Nucleotide and amino acid sequences obtained, were compared with complete homologous sequences of selected MDV-1 strains with different degrees of pathogenicity retrieved from *GenBank*. Phylogenetic analysis of *meq* genes was performed.

All the eight strains from vaccinated commercial flocks and two from unvaccinated backyard chickens, affected all by acute form, clustered together and with published Polish strains isolated in the last decade. Their sequences may be ascribed to virulent and very virulent MDVs. Eight out of ten strains from unvaccinated backyard chickens with classical form were closely related to mild and attenuated ones.

In conclusion high virulence MDVs seems to circulate mostly in Italian commercial compartment where vaccination is routinely applied, while the rural sector is still affected by mild viruses probably due to the absent or lower vaccine pressure.

INTRODUZIONE

Il virus della malattia di Marek o *Gallid alphaherpesvirus 2* è un herpesvirus appartenente alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, genere *Mardivirus*, responsabile nel pollo di una patologia a carattere linfoproliferativo. La malattia può manifestarsi con differenti forme patologiche dipendentemente dalla virulenza del ceppo virale, dalle vaccinazioni eseguite e dalla genetica dell'animale. Le due forme patologiche più rilevanti sono quella classica con sintomatologia neurologica e quella acuta caratterizzata da linfomi viscerali multipli. L'infezione avviene per via aerogena, il virus è linfotropo e replica principalmente nei linfociti T che rappresentano il mezzo di diffusione del virus nell'organismo e gli consentono di raggiungere l'epitelio dei follicoli delle penne. A questo livello avviene l'infezione interamente produttiva, con eliminazione nell'ambiente di virioni completi ed infettanti, mediante desquamazione (Calneck *et al.*, 1970). Nell'ambiente il virus rimane potenzialmente infettante per 4-8 mesi nei residui della desquamazione cutanea, nella lettiera e nella polvere ambientale (Witter *et al.*, 1968).

Il virus riconosce diversi patotipi denominati *mild*, *virulent*, *very virulent*, *very virulent plus* (Schat e Nair, 2008).

La malattia in Italia è stata segnalata negli ultimi anni sia nel settore industriale (Piccirillo, 2011; Camarda e di Pineto, 2012) che in quello rurale (Mescolini *et al.*, 2015).

Nel contesto industriale i focolai sono sporadici e generalmente si manifestano nella forma acuta, nonostante venga eseguita sistematicamente la vaccinazione di tutti i soggetti in incubatoio o *in ovo*, al 18° giorno di incubazione, oppure al primo giorno di vita. Negli allevamenti rurali invece, dove la vaccinazione non viene sempre impiegata, sono state rilevate sia la forma acuta viscerale sia quella classica nervosa.

A tutt'oggi i dati relativi alla caratterizzazione molecolare dei ceppi MDV-1 circolanti in Italia sono carenti. Scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare dal punto di vista molecolare ceppi virali evidenziati sia in ambito industriale sia in contesto rurale.

MATERIALI E METODI

Campioni biologici

Nel periodo compreso tra ottobre 2014 e aprile 2016, 18 campioni biologici di diversa tipologia sono stati prelevati da 8 allevamenti industriali e 10 rurali. La natura del campione, la provenienza, la tipologia di allevamento e i segni clinici o le lesioni anatomopatologiche osservate sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Provenienza, tipologia di allevamento, sintomi/lesioni evidenziate e tipo di campioni analizzati.

Nome ceppo	Provenienza	Animali	Sintomi/lesioni	Campione
419-15	Emilia Romagna	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
456-15	Emilia Romagna	Industriali (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Penne
487-15	Piemonte (Cuneo)	Rurali (razze ornamentali)	Neoplasie viscerali	Penne
498-15	Emilia Romagna	Industriali (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Penne
507-15	Sardegna	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
509-15	Lazio (Roma)	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
510-15	Lazio (Roma)	Rurali (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
513-15	Emilia Romagna	Industriale (ovaiole)	Neoplasie viscerali	Milza
515-15	Emilia Romagna	Industriale (ovaiole)	Neoplasie viscerali	Neoplasia ovarica
559-15	Veneto	Industriale (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Milza
561-15	Friuli	Industriale (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Milza
562-15	Lazio	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
565-15	Veneto	Industriale (riproduttori pesanti)	Neoplasie viscerali	Milza
567-15	Emilia Romagna	Industriale (galletti)	Neoplasie viscerali	Milza
599-16	Lazio	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
600-16	Toscana	Rurale (livornese)	Neoplasie viscerali	Penne
608-16	Sardegna	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne
610-16	Liguria (Genova)	Rurale (razze ornamentali)	Neurologici	Penne

Estrazione del genoma e PCR

L'estrazione del DNA virale da penne ed organi è stata eseguita utilizzando il kit "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Il DNA estratto è stato successivamente amplificato per il gene *meq* è stato seguendo il protocollo descritto da Hassanin *et al.*, 2013. I primers utilizzati sono *meq*-F 5'- ATGTCTCAGGAGCCAGAGCCG- 3' e *meq*-R 5'- GGGTCTCCCGTGACCTGG- 3'. I prodotti di PCR sono stati visualizzati, mediante luce ultravioletta dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio all' 1% addizionato con bromuro di etidio.

Allineamento, analisi di sequenza ed analisi filogenetica

Gli amplificati del gene *meq* sono stati sequenziati presso il centro di sequenziamento Macrogen Europe. L'allineamento delle sequenze è stato eseguito utilizzando il programma *Clustal W* all'interno del software *BioEdit Alignment Editor*. L'analisi di sequenza è stata eseguita paragonando i ceppi di campo tra loro e con ceppi virali a diverso grado di patogenicità disponibili in *GenBank*. È stato inclusa nell'analisi anche la sequenza del gene *meq* di un ceppo vaccinale tipo Rispens comunemente utilizzato in Italia e qui denominato Risp 1. In Tabella 2 sono elencati i nomi dei ceppi di riferimento, il paese di origine, il patotipo (se noto) e il numero di accesso in *GenBank* relativamente alla sequenza del gene *meq*. L'analisi delle sequenze amminoacidiche delle proteine Meq ha previsto il conteggio del numero di ripetizioni di 4 proline (PPPP) e la valutazione del contenuto percentuale in prolina.

È stata inoltre eseguita un'analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche del gene *meq* e di quelle amminoacidiche della proteina Meq dei ceppi virali elencati nelle tabelle 1 e 2 e del ceppo vaccinale Risp 1. L'albero filogenetico è stato realizzato utilizzando il software MEGA6 con l'algoritmo *Neighbor-Joining*. Solo i nodi con valore di bootstrap (calcolato su 1000 replicati) pari o maggiore a 70 sono stati considerati attendibili.

Tabella 2. Ceppi di MDV di riferimento pubblicati su *GenBank* utilizzati in questo studio.

ISOLATO	PAESE D'ORIGINE	PATOTIPO	N°ACCESSO del GENE <i>meq</i> (<i>GenBank</i>)
MPF57	Australia	vMDV	EF523774.1
04CRE	Australia	vMDV	EF523773.1
02LAR	Australia	vvMDV	EF523772.1
FT158	Australia	vvMDV	EF523771.1
CVI988/ Rispons(Intervet)	Olanda	attMDV	DQ534538.1
CU-2	USA	mMDV	AY362708.1
BC-1	USA	vMDV	AY362707.1
GA	USA	vMDV	M89471.1
JM102	USA	vMDV	HM488348.1
RB1B	USA	vvMDV	AY243332.1
RL	USA	vv+MDV	AY362720.1
TK	USA	vv+MDV	AY362721.1
N	USA	vv+MDV	AY362718.1
New	USA	vv+MDV	AY362719.1
U	USA	vv+MDV	AY362722.1
W	USA	vv+MDV	AY362723.1
X	USA	vv+MDV	AY362724.1
549	USA	vvMDV	AY362714.1
567	USA	vMDV	AY362709.1
571	USA	vMDV	AY362710.1
595	USA	vvMDV	AY362715.1
648a	USA	vv+MDV	AY362725.1
686	USA	vv+MDV	AY362727.1
3004	Russia	attMDV	EU032468.1
ATE	Ungheria	vvMDV	AY571784.1
108_11	Polonia	-	KJ464831.1
116_11	Polonia	-	KJ464833.1
121_11	Polonia	-	KJ464834.1
122_11	Polonia	-	KJ464835.1
6_12	Polonia	-	KJ464837.1
56_12	Polonia	-	KJ464839.1
24_00	Polonia	-	KJ464764.1

RISULTATI

PCR del gene *meq*

Tutti i campioni esaminati sono risultati positivi alla reazione di PCR per il gene *meq*, evidenziando prodotti di PCR di peso molecolare differente (Figura 1). Come risultato dell'amplificazione del genoma virale dei diversi campioni elencati in Tabella 1, è stata evidenziata la presenza di bande aventi peso molecolare differente a seconda del ceppo considerato. Nella Figura 1 sono riportate a titolo di esempio due bande di dimensioni diverse ottenute dalla PCR dei geni *meq* dei ceppi 419-14 e 456-15.



Figura 1. Elettroforesi in gel di agarosio dei prodotti di PCR del gene *meq* ottenuti (relativi ai ceppi 419-14 e 456-15). Linea 1: Marker Bioline (M). Linea 2: campione 419-14. Linea 3: campione 456-15. Linea 4: controllo negativo.

Analisi di sequenza e filogenetica del gene *meq*

Le sequenze nucleotidiche del gene *meq* sono state confrontate tra loro e con quelle dei ceppi a diversa patogenicità disponibili in *GenBank*. Come sequenza di riferimento è stata scelta quella del gene *meq* (1200 paia di basi) del vaccino commerciale CVI988/Rispens (Intervet), *GenBank accession number* DQ534538.1, avente una proteina Meq costituita da 399 amminoacidi (aa).

Sulla base dell'analisi di sequenza sono stati identificati diversi ceppi virali. I ceppi 456-15, 498-15, 513-15, 515-15, 559-15, 561-15, 565-15, 567-15 e 600-16, tutti rilevati in allevamenti industriali tranne il ceppo 600-16, presentavano un'identità di sequenza *meq* del 100% sia tra loro sia con le sequenze *meq* di ceppi MDV-1 rilevati in Polonia (*GenBank accession numbers*: KJ464831.1, KJ464833.1, KJ464834.1, KJ464835.1, KJ464837.1, KJ464839.1, KJ464764.1). Rispetto al ceppo vaccinale CVI988/Rispens, tali ceppi presentavano una delezione di 180 paia di basi corrispondente, nella proteina Meq, ad una delezione di 60 aa. La lunghezza della proteina risultava quindi di 339 aa vs i 399 della proteina del ceppo vaccinale CVI988/Rispens. All'analisi della sequenza nucleotidica sono state evidenziate 6 mutazioni puntiformi, tutte codificanti per amminoacidi differenti da quelli del ceppo vaccinale CVI988/Rispens. Le mutazioni e le loro posizioni nella proteina sono riportate in Tabella 3. Il numero totale di PPPP è risultato pari a 4 a differenza delle 8 del ceppo vaccinale, ciò è dovuto alla presenza di una mutazione puntiforme in posizione 218 (278 per CVI988) responsabile dell'interruzione di una ripetizione di 4 proline per la traduzione di una serina al posto di una prolina in posizione 3 (PPSP invece che PPPP).

Il ceppo 487-15, rilevato in un allevamento rurale, mostrava una percentuale di identità nucleotidica del 100% con il ceppo polacco 24-00 (*GenBank accession number* KJ464764.1). Rispetto al ceppo CVI988/Rispens la sequenza della proteina Meq del ceppo 487-15 mostrava una delezione e mutazioni puntiformi analoghe ai ceppi sopraelencati eccetto la presenza di una prolina in posizione 218 (Tabella 3). Erano quindi presenti 5 PPPP in luogo di 4.

L'analisi di sequenza ha poi evidenziato come il gene *meq* dei ceppi rurali 419-14, 507-15, 509-15, 510-15, 562-15 e 599-16 (1257 pb), rispetto a CVI988/Rispens, presentasse un'inserzione di 57 paia di basi, corrispondente ad un'inserzione di 19 aa nel dominio di transattivazione della proteina Meq (Tabella 4) e 9 mutazioni nucleotidiche puntiformi, di cui 8 codificanti (Tabella 3). La lunghezza della proteina Meq era di 418 aa. Il numero di ripetizioni di 4 proline era pari a 9, una in più rispetto a quelle rilevate all'analisi di sequenza di CVI988/Rispens.

La sequenza nucleotidica del ceppo rurale 608-16 presentava invece mutazioni puntiformi uguali a quelle rilevate nei ceppi sopraccitati tranne, che per due mutazioni puntiformi uguali a quelle dei ceppi vv e vv+, di cui una codificante (posizione 180 alanina in luogo di treonina). Era inoltre presente una delezione di 9 paia di basi (3aa) rispetto al ceppo vaccinale CVI988/Rispens, che si traduceva in una proteina Meq di 396 aa. Il numero di ripetizioni di 4 proline era 8 come nel caso del ceppo CVI988/Rispens (Tabella 4).

È stata inoltre eseguita l'analisi di sequenza di un ceppo vaccinale tipo Rispens utilizzato in Italia (Risp 1). Il gene *meq* di questo ceppo presentava una lunghezza di 1197 bp e due mutazioni puntiformi codificanti, rispetto al gene *meq* di CVI988/Rispens. Erano presenti 7 ripetizioni di 4 proline e non 8.

Il ceppo rurale 610-16 mostrava la stessa sequenza nucleotidica del gene *meq* di Risp 1 ma, rispetto a questo, presentava un'inserzione di 57 paia di basi. Il numero di PPPP era pari a 8 e la lunghezza totale della proteina Meq era di 417 amminoacidi.

Tabella 3. Sostituzioni amminoacidiche nella proteina Meq dei diversi ceppi presi in esame*, in grigio sono evidenziati gli amminoacidi comuni al maggior numero di ceppi, nelle caselle bianche invece sono presenti le mutazioni puntiformi specifiche.

Patotipo	Ceppo	37	66	71	77	80	93	98	101	110	119	139	153	176	180	242	217 277	218 278	326 386
att	CVI988	H	G	S	E	D	Q	H	K	C	C	T	P	P	T	F	P	P	I
-	419-14																		
-	507-15																		
-	509-15	R	R	S	E	E	R	D	N	C	C	A	P	P	T	I	P	P	T
-	510-15																		
-	562-15																		
-	599-16																		
-	456-15																		
-	498-15																		
-	513-15																		
-	515-15																		
-	559-15	H	R	A	E	Y	Q	H	K	S	C	T	P	P	T	-	P	S	T
-	561-15																		
-	565-15																		
-	567-15																		
-	600-16																		
-	487-15	H	R	A	E	Y	Q	H	K	S	C	T	P	P	T	-	P	P	T
-	608-16	R	R	S	E	E	R	D	N	C	C	A	P	P	A	I	P	P	T
Vv+	X	H	R	S	K	D	Q	H	K	C	R	T	Q	A	A	-	A	P	T
vv	549	H	R	S	K	D	Q	H	K	C	C	T	Q	A	A	-	A	P	T
v	GA	H	R	S	K	D	Q	H	K	C	R	T	P	P	T	-	P	P	T

*A = alanina; C = cisteina; D = acido aspartico; E = acido glutammico; F = fenilalanina; G = glicina; H = istidina; I = isoleucina; K = lisina; N = asparagina; P = prolina; Q = glutammina; R = arginina; S = serina; T = treonina; Y = tirosina

All'analisi filogenetica è stato osservato che i ceppi 456-15, 498-15, 513-15, 515-15, 559-15, 561-15, 565-15, 567-15, 600-16 rientravano in un unico cluster insieme ai ceppi isolati in Polonia (percentuale di identità nucleotidica e amminoacidica del 100%). Le percentuali d'identità nucleotidica ed amminoacidica con le sequenze dei ceppi a patogenicità nota disponibili in *GenBank* scendevano a valori minori del 98,5%. I valori più elevati sono stati riscontrati con le sequenze dei ceppi *virulent*, *very virulent* e *very virulent plus*.

Il ceppo 487/15 rientrava nel cluster sopracitato però presentava 5 ripetizioni di 4 proline analogamente ai ceppi vvMDV 04CRE, 02LAR e RB1B.

Anche i ceppi 419-14, 507-15, 509-15, 510-15, 562-15 e 599-16 rientravano in un cluster distinto, insieme al ceppo very virulent ATE (Figura 2). Questi ceppi presentavano il più alto numero di ripetizioni di 4 proline (9) ed un elevato contenuto percentuale di prolina (23,6%) (Tabella 4). Le più alte percentuali d'identità nucleotidiche del gene *meq* di ceppi sono state riscontrate con quelle dei ceppi attenuati CVI988/Rispens e 3004 e mild CU-2.

Tabella 4. Caratteristiche della proteina Meq nei ceppi elencati nelle Tabelle 1 e 2.

ISOLATO	DIMENSIONE MEQ (aa)	DIMENSIONE INSERZIONE (aa)	% PROLINA	NUMERO DI PPPP	PATOTIPO
MPF57	398	59	22,9	5	vMDV
04CRE	398	59	22,2	5	vMDV
02LAR	398	59	22,2	5	vvMDV
FT158	398	59	22,9	5	vvMDV
CVI988/Rispens	399	60	23,3	8	attMDV
Risp 1	398	59	23,06	7	
CU-2	398	59	23,1	7	mMDV
BC-1	398	59	23,1	7	vMDV
GA	339	-	21,5	4	vMDV
JM102	398	59	23,1	6	vMDV
RB1B	339	-	21,5	5	vvMDV
RL	339	-	20,6	2	vv+MDV
TK	339	-	20,6	2	vv+MDV
N	339	-	20,9	2	vv+MDV
New	339	-	20,7	2	vv+MDV
U	339	-	20,9	2	vv+MDV
W	339	-	21,2	4	vv+MDV
X	339	-	20,6	2	vv+MDV
549	339	-	20,6	2	vvMDV
567	339	-	21,2	4	vMDV

571	339	-	21,2	3	vMDV
595	339	-	20,6	2	vvMDV
648A	339	-	20,9	2	vv+MDV
686	339	-	20,9	2	vv+MDV
3004	398	59	23,1	6	attMDV
LMeq	398	59	23,1	7	ND
ATE	339	-	21,47	5	
6_12	339	-	21,2	4	ND
56_12	339	-	21,2	4	ND
122_11	339	-	21,2	4	ND
121_11	339	-	21,2	4	ND
116_11	339	-	21,2	4	ND
108_11	339	-	21,2	4	ND
419-14 507-15 509-15 510-15 562-15 599-16	418	79	23,63	9	ND
456-15 498-15 513-15 515-15 559-15 561-15 565-15 567-15 600-16	339	-	21,18	4	ND
487-15	339	-	21,47	5	ND
608-16	396	57	22,92	8	ND
610-16	417	78	23,44	8	ND

att=attenuato; m=mild; v=virulent; vv=very virulent; vv+= very virulent plus; ND= non determinato.

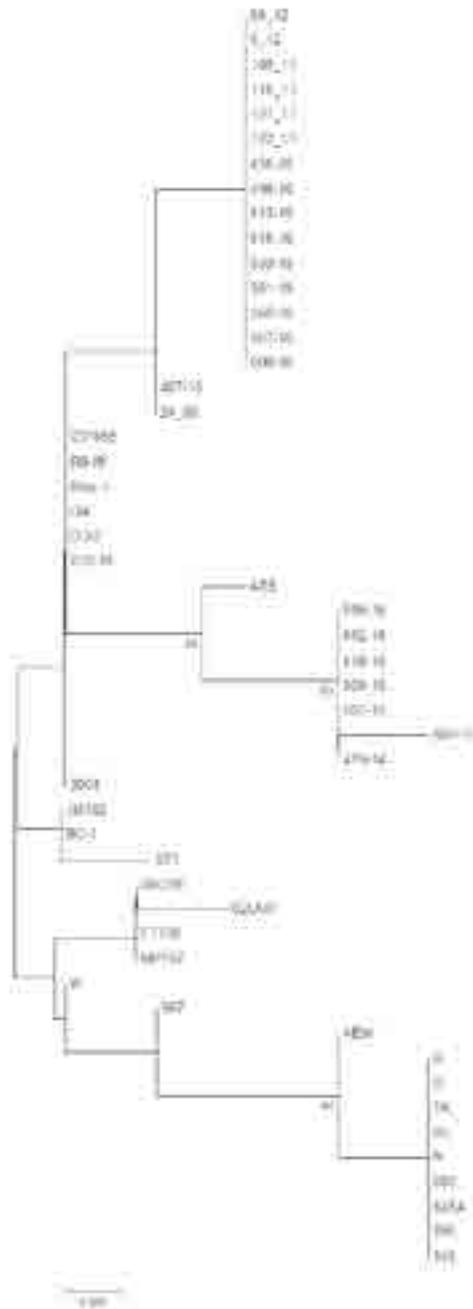


Figura 2. Albero filogenetico relativo alle sequenze della proteina Meq dei diversi ceppi virali elencati nelle Tabelle 1 e 2.

DISCUSSIONE

I ceppi di MDV-1 analizzati in questo studio sono stati rilevati in animali, sia rurali che industriali, vaccinati o meno, colpiti da differenti forme patologiche ascrivibili alla malattia di Marek.

È stato scelto il gene *meq* per la caratterizzazione molecolare dei virus rilevati poiché è quello che permette una migliore differenziazione dei ceppi virali per la presenza di mutazioni correlabili alla virulenza in ceppi virali appartenenti a patotipi differenti (Shamblin *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2000). Esso viene considerato il gene di MDV-1 maggiormente coinvolto nell' oncogenesi (Lupiani *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2009). Le dimensioni del gene *meq full length* amplificato, variavano nei diversi ceppi di MDV-1 a seconda dell'isoforma del gene (Chang *et al.*, 2002 a; Chang *et al.*, 2002 b). Nel settore industriale gli animali sottoposti a necropsia presentavano le tipiche lesioni anatomopatologiche associate alla forma viscerale della malattia di Marek con marcate epatomegalia e splenomegalia. In tutti questi animali sono stati rilevati ceppi che presentavano la stessa sequenza della proteina Meq (339 aa), contenute un basso livello percentuale di prolina (21,1%) e un basso numero di ripetizioni di 4 proline (4). Questi dati, insieme alle maggiori percentuali di identità nucleotidica riscontrate con ceppi a maggior virulenza fanno pensare che questi ceppi appartengano ad un patotipo virulento. Tutti questi ceppi inoltre rientravano in un unico cluster all'analisi filogenetica, insieme ai ceppi isolati in Polonia. Nella maggior parte degli allevamenti era stato impiegato un protocollo vaccinale rigoroso: la vaccinazione era eseguita sia *in ovo* sia al primo giorno di vita con un vaccino bivalente Rispens + HVT. Le cause di rottura vaccinale potevano essere disparate e tra queste vi erano: la virulenza del ceppo virale, errori nella somministrazione o nella gestione del vaccino (dose non adeguata, errori nella ricostituzione e nel mantenimento della catena del freddo), la sensibilità legata alla genetica, la presenza di patologie immunodepressive concomitanti e gli eventi stressanti.

Nel settore rurale la maggior parte delle forme patologiche rilevate erano ascrivibili alla forma classica della malattia di Marek con sintomatologia neurologica (paralisi spastica degli arti). Questi animali all' esame necroscopico evidenziavano un aumento di volume più o meno marcato dei nervi periferici. In tutti questi casi è stata rilevata la presenza di ceppi virali aventi la stessa sequenza del gene *meq* che codificava per una proteina di 418 aminoacidi, con un inserzione di 19 aminoacidi rispetto al ceppo vaccinale CVI988/Rispens, un elevato contenuto percentuale di prolina (23,6%) e la presenza di 9 ripetizioni di quattro proline nel dominio di transattivazione. Quest'ultima caratteristica dovrebbe determinare una super repressione dell'attività di transattivazione della proteina Meq ed una riduzione dell'oncogenicità di questi ceppi (Chang *et al.*, 2002a). In nessuno degli animali esaminati sono stati rilevati linfomi viscerali, ciò permette di pensare che il virus possieda bassa oncogenicità. Anche l'elevata percentuale di identità nucleotidica con il gene *meq* di ceppi *mild* e attenuati è un ulteriore conferma di quanto detto sopra. È importante ricordare come questi ceppi presentino una serie di mutazioni puntiformi uniche e assenti in tutti gli altri ceppi analizzati e come all'analisi filogenetica essi rientrino in un cluster distinto.

Oltre ai ceppi sopra descritti, in ambito rurale sono stati evidenziati 2 ceppi virali potenzialmente ascrivibili a patotipo virulento. Un ceppo è stato rilevato in un allevamento sito a Cuneo in cui la mortalità aveva sfiorato il 100% per neoplasie viscerali

multiple ed il gene *meq* codificava per una proteina di 339 aa con 5 PPPP e un basso contenuto % di prolina (21,47). Nell'altro focolaio, verificatosi in un allevamento sito in Toscana, vi era un'elevata mortalità con associata epatomegalia, splenomegalia ed aumento di spessore della parete dello stomaco ghiandolare. Il gene *meq* di questo ceppo presentava una percentuale di identità nucleotidica pari al 100% con i ceppi rilevati nel settore industriale.

Va ricordato che la patotipizzazione dei ceppi di MDV-1 richiede prove *in vivo* secondo il metodo ADOL proposto da Witter nel 1997 e rivisitato sempre da Witter *et al.* nel 2005, basato sull'induzione di lesioni linfoproliferative in animali vaccinati. Deve essere valutata anche la diversa sensibilità genetica alla malattia nelle diverse razze di animali. È noto che certi aplotipi del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) o complesso B del pollo possano determinare suscettibilità o resistenza nei confronti della malattia. In particolare è noto che l'aplotipo B¹⁹ conferisce suscettibilità mentre l'aplotipo B²¹ conferisce resistenza nei confronti della malattia di Marek (Wang *et al.*, 2014). È possibile che gli animali vaccinati che presentavano la patologia fossero quelli maggiormente suscettibili, lo stesso vale per gli animali rurali colpiti dalla forma classica della malattia. Per tali motivi l'aplotipo dell'MHC di questi soggetti verrà in futuro determinato mediante approccio molecolare.

In conclusione ceppi del virus della malattia di Marek ad elevata virulenza sembrano circolare sia nel settore industriale, nonostante la vaccinazione venga routinariamente applicata, sia nel settore rurale. Nel settore rurale, dove nella maggior parte dei casi gli animali non vengono vaccinati, è stata riscontrata anche la presenza di ceppi virali a bassa virulenza. È necessario tenere conto del fatto che i dati ottenuti in questo studio sono molecolari e che future indagini saranno indirizzate all'isolamento e alla patotipizzazione *in vivo* al fine di confermare la reale circolazione di ceppi con tali caratteristiche.

BIBLIOGRAFIA

Brown, A. C., L. P. Smith, L. Kgosana, S. J. Baigent, V. Nair, and M. J. Allday 2009. Homodimerization of the Meq Viral Oncoprotein Is Necessary for Induction of T-Cell Lymphoma by Marek's Disease Virus. *J. Virol.* 83:11142–11151.

Calnek, B.W., Adldinger, H.K., Kahn, D.E., 1970. Feather follicle epithelium: a source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Diseases* 14, 219-233.

Camarda A., di Pineto L., 2012. Stato sanitario della gallina ovaioia in Italia. Atti del LI Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Salsomaggiore Terme 11-12 ottobre 2012.

Chang, K.S., Lee, S.I., Ohashi, K., Ibrahim, A., Onuma, M., (2002a). The detection of the *meq* gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1. *Journal of Veterinary Medical Science* 64, 413-417.

Chang, K.S., Ohashi, K., Onuma M., (2002b). Diversity (Polymorphism) of the *meq* Gene in the Attenuated Marek's Disease Virus (MDV) Serotype 1 and MDV-Transformed Cell Lines. *Journal of Veterinary Medical Science* 64: 1097-1101.

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 Diseases* 57: 555-561.

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. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 287-292.

Lupiani B, Lee L.F, Cui x, Gimeno I, Anderson A, Morgan R.W, Silva R.F, Witter R.L, Kung H-J, Reddy S.M, 2000. Marek's disease virus-encoded Meq gene is involved in transformation of lymphocytes but is dispensable for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11815-11820.

Mescolini G., Lupini C., Felice V., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Catelli E. (2015). Caratterizzazione molecolare di un ceppo mild del virus della malattia di Marek evidenziato in polli rurali con forma nervosa. Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2015. LIV Convegno annuale. Forlì, 16-17 aprile 2015. pp 230-244.

Piccirillo,A., 2011. Malattia di Marek nei riproduttori pesanti: una malattia riemergente del settore avicolo? Atti del L Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì7-8 aprile 2011.

Silva, R.F., Reddy, S.M., Lupiani, B., 2004. Expansion of a unique region in the Marek's disease virus genome occurs concomitantly with attenuation but is not sufficient to cause attenuation. *Journal of Virology*78, 733-740.

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. *Veterinary Microbiology* 102, 147-167.

Wang¹ H, Ma¹ T, Chang G, Wan F, Liu X, Liu L, Xu L, Chen J, Chen G, 2014. Molecular Genotype Identification of Different Chickens: Major Histocompatibility Complex. *The Open Access Journal of Sciences and Technology* 2.

Witter, R.L., 1997. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases* 41, 149-163.

Witter, R.L., Burgoyne, G.H., Burmester, B.R., 1968. Survival of Marek's disease agent in litter and droppings. *Avian Diseases* 12, 522-530.

Witter, R.L., Calnek, B.W., Buscaglia, C., Gimeno, I.M., Schat, K.A., 2005. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology* 34, 75-90.