

ANALISI FILOGENETICA DI CEPPI DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE CIRCOLANTI IN EUROPA

Mescolini G.¹, Franzo G.², Lupini C.¹, Cecchinato M.², Tucciarone C.M.², Felice V.¹, Blanco A.³, Biarnes M.³, Legnardi M.², Silveira F.¹, 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 *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD) - Italia.*

³ *CESAC - Centre de Sanitat Avícola de Catalunya i Aragó, Ctra. Castellvell, s/n, Reus, 43206 Spain.*

Summary

Sequences of partial G gene of European subtype B Avian Metapneumovirus (aMPV) strains, collected from 2014 to 2018, during routine molecular diagnostic activity, were analyzed. Nucleotide and amino acid sequences were edited and assembled using BioEdit software, aligned using Clustal W and compared with sequences of subtype B aMPVs collected prior to that period or sequences retrieved from GenBank. Sequences of most commonly used commercial vaccine strains were also included. Phylogenetic analysis, performed using Maximum Likelihood method, demonstrated that aMPV subtype B has evolved in Europe from its first appearance. In recent times different field virus populations co-exist in Europe (maximum genetic distance 5,5%) suggesting that the protection achieved using current commercial vaccines should be reevaluated. Along with field strains, a few vaccine-derived viruses are circulating. These strains were found sometimes during outbreaks of respiratory disease, confirming that reversion to virulence of live vaccines is likely to occur. The insights offered by the molecular characterization of aMPVs circulating in poultry could allow to better address the strategies to control aMPV infection in poultry.

INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus aviare* (aMPV) è un virus a RNA non segmentato, a singolo filamento con polarità negativa appartenente all'ordine *Mononegavirales*, famiglia *Pneumoviridae*, genere *Metapneumovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2015). Il virus viene classificato in 4 sottotipi (A, B, C e D) distinguibili in base alle caratteristiche antigeniche e genetiche (Juhász and Easton, 1994; Bayon-Auboyer et al., 2000; Seal, 2000). aMPV riconosce come ospiti naturali il tacchino (Jones e Rautenschlein, 2013) il pollo (Hafez, 1993), la faraona (Cecchinato et al., 2013b), il fagiano (Catelli et al., 2001) e l'anatra (Toquin et al., 1999). Nel tacchino e nel pollo l'infezione da *Metapneumovirus* può indurre una forma respiratoria che nel tacchino prende il nome di Rinotracheite del Tacchino (TRT) e nel pollo è caratterizzata da sintomatologia clinica più lieve, ma può esitare nella Sindrome della Testa Gonfia (SHS). In entrambe le specie il virus può causare cali dell'ovodeposizione.

In Europa i primi isolamenti del virus risalgono alla seconda metà degli anni

'80 (McDougall and Cook, 1986). Solo a partire del 1994, i ceppi circolanti in Europa sono stati caratterizzati dal punto di vista molecolare e riconosciuti in prevalenza appartenenti ai sottotipi A e B (Juhasz and Easton, 1994).

Per il controllo della malattia, a partire dagli anni '90 sono stati messi a punto, e resi disponibili in commercio, vaccini vivi attenuati o inattivati.

A tutt'oggi aMPV si può considerare endemico in Europa. Dati relativi alle caratteristiche molecolari dei ceppi circolanti sono piuttosto scarsi e limitati a pochi paesi europei (Franzo et al., 2017; Tucciarone et al., 2017, 2018). Il sottotipo B risulta comunque essere il prevalente.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di ampliare le informazioni disponibili sull'epidemiologia molecolare di aMPV caratterizzando ceppi appartenenti al sottotipo B evidenziati negli ultimi anni in Europa.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 90 ceppi di aMPV sottotipo B evidenziati negli anni 2014-2018 durante attività diagnostica di routine eseguita dall'Università di Bologna, dall'Università di Padova e, in Spagna, dal Centre de Sanitat Avícola De Catalunya – CESAC. I campioni di partenza erano costituiti da tamponi rino-faringei prelevati da gruppi di polli o tacchini, vaccinati o meno per aMPV. I ceppi provenivano da 5 Paesi Europei, in particolare da Francia (n.15), Germania (n.1), Italia (n.9), Romania (n.29) e Spagna (n.36).

Estrazione dell'RNA e RT-PCR per aMPV

L'RNA veniva estratto da pool di 10 tamponi, quindi analizzato con due approcci diversi a seconda del laboratorio. All'Università di Bologna e al CESAC veniva eseguita una RT-nested PCR per aMPV sottotipo specifica in grado di evidenziare e distinguere i sottotipi A e B tramite amplificazione di un frammento del gene G (Cavanagh et al., 1999). All'Università di Padova questo protocollo era preceduto da Real-Time RT-PCR di screening anch'essa sottotipo A e B specifica (Cecchinato et al., 2013a).

Analisi di sequenza e filogenetica

I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati, le sequenze analizzate con l'ausilio del *software* BioEdit Alignment Editor, allineate utilizzando l'accessory application Clustal W e confrontate con sequenze omologhe, di ceppi aMPV-B evidenziati in Europa a partire dalla seconda metà degli anni '80, di vaccini aMPV sottotipo B comunemente impiegati in Europa e di altri ceppi Europei disponibili in GenBank. L'analisi filogenetica è stata eseguita utilizzando il metodo Maximum Likelihood nel programma MEGA7.

RISULTATI

L'albero filogenetico generato con le sequenze ottenute mostra un'evoluzione di aMPV sottotipo B negli anni (massima distanza genetica 5,5%). Sono evidenti diversi cluster strettamente correlati all'origine geografica dei ceppi (come nel caso di Italia, Francia, Romania e Spagna) e cluster popolati da virus provenienti da paesi diversi (Italia e Grecia) (Figura 1).

I ceppi isolati prima del 2000 formano un cluster distinto assieme ai vaccini e ad un consistente numero di virus analizzati nel presente studio che, per queste caratteristiche genetiche, sono da considerarsi di derivazione vaccinale.

L'analisi filogenetica non ha permesso di evidenziare correlazione con la specie ospite: ceppi circolanti in polli o tacchini rientrano indistintamente all'interno dello stesso cluster.

Gli alberi filogenetici costruiti con le sequenze provenienti dai singoli Paesi hanno mostrato come la popolazione virale Rumena sia piuttosto omogenea mentre quella Francese, Spagnola o Italiana mostri una certa eterogeneità, come si può evincere dal fatto che ci siano cluster distinti. Nel caso dei ceppi Italiani e Spagnoli è anche riscontrabile una certa evoluzione temporale.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Nonostante il largo impiego della vaccinazione, l'infezione da aMPV rappresenta ancora un problema in Europa, probabilmente a causa dell'eterogeneità genetica del virus che tende ad evolvere nel tempo e nelle diverse aree geografiche (Cecchinato et al., 2010; Tucciarone et al., 2017) ed alla tendenza alla reversione a virulenza dei vaccini disponibili (Catelli et al., 2010). A conferma di ciò nel presente studio sono state evidenziate popolazioni virali di campo distinte sia fra i diversi Paesi, sia all'interno degli stessi, assieme a numerosi ceppi di origine vaccinale. Al fine di migliorare le strategie di profilassi nei riguardi di questa infezione sarà necessario valutare la protezione conferita dai vaccini disponibili in commercio nei confronti dei ceppi emergenti.

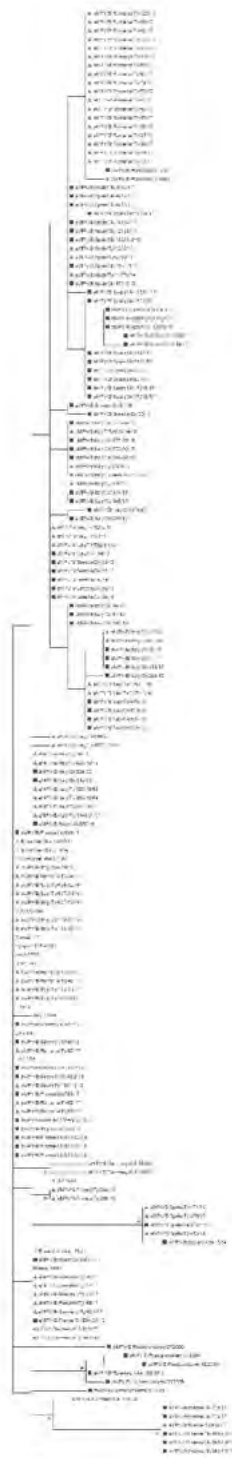


Figura 1. Albero filogenetico relativo a sequenze parziali del gene G di ceppi aMPV sottotipo B Europei e di ceppi vaccinali.

- vaccini; ■ pollo; ▲ tacchino; ◆ faraona.

BIBLIOGRAFIA

1. 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 (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.* 81, 2723–2733.
2. Catelli E, De Marco MA, Delogu M, Terregino C, and V. Guberti. (2001). Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. *Vet. Rec.* 149, 56–58.
3. Catelli E, Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Brown P and CJ Naylor. (2010). Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. *Vaccine* 28, 916–921.
4. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P and CJ Naylor. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28, 593–605.
5. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Battilani, M and CJ Naylor. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Vet. Microbiol.* 146, 24–34.
6. Cecchinato M, Lupini C, Munoz Pogoreltseva OS, Listorti V, Mondin A, Drigo M and E Catelli. (2013a). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathol.* 42, 283–289.
7. Cecchinato M, Morandini E, Listorti V, Lupini C, Pesente P, Giovanardi D, Rossi G, Sperati Ruffoni L and E Catelli. 2013b. Molecular characterization of an Avian Metapneumovirus strain isolated in
8. guinea fowls (*Numida meleagris*) experiencing respiratory disease. In: 18th World Veterinary Poultry Congress, Nantes, France, pp. 401–402.
9. Franzo G, Tucciarone CM, Enache M, Bejan V, Ramon G, Koutoulis KC and M Cecchinato. (2017). First Report of Avian Metapneumovirus Subtype B Field Strain in a Romanian Broiler Flock During an Outbreak of Respiratory Disease. *Avian Dis.* 61, 250–254.
10. Hafez HM. (1993). The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens - review. *Arch. FUR Geflugelkd.* 57, 181–185.
11. Jones RC and S Rautenschlein. (2013). Avian metapneumovirus. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L. and Nair, V. (eds) *Diseases of Poultry*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, pp. 125–138.
12. Juhasz K and AJ Easton. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: Evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75, 2873–2880.
13. McDougall JS and JK Cook. (1986). Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. *Vet. Rec.* 118, 206–207.
14. Seal BS. (2000). Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America. *Anim Heal. Res Rev* 1, 67–72.
15. Toquin D, Bāyon-Auboyer MH, Eterradossi N, Jestin V and H Morin. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet Rec.* 145, 680.
16. Tucciarone CM, Andreopoulou M, Franzo G, Prentza Z, Chaligiannis I and M Cecchinato. (2017). First Identification and Molecular Characterization of Avian metapneumovirus Subtype B from Chickens in Greece. *Avian Dis.* 61.
17. Tucciarone CM, Franzo G, Lupini C, Alejo CT, Listorti V, Mescolini G, Brandão PE, Martini M, Catelli E and M Cecchinato. (2018). Avian Metapneumovirus circulation in Italian broiler farms. *Poult. Sci.* 97, 503–509.