

## RICERCA DI AVIAN METAPNEUMOVIRUS (aMPV) IN VOLATILI SELVATICI

Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Legnardi M.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>2</sup>, Quaglia G.<sup>2</sup>, Dal Molin E.<sup>3</sup>, Gobbo F.<sup>3</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italia;

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD), Italia.

### Summary

The interest towards avian Metapneumovirus (aMPV) has recently increased due to the discovery of two new subtypes in gulls and parakeets, in addition to the four already known subtypes (A-D). The circulation of these subtypes in wild birds highlighted the necessity for a continuous evaluation of aMPV epidemiology to assure a strict monitoring of the wild and domestic animal interface and provide new diagnostic tools as the risk of new virus spread to farmed animals becomes tangible. With this aim, a molecular survey by multiplex real time RT-PCR for the detection of known and new aMPV subtypes was conducted on wild birds sampled during avian Influenza surveillance activity. All birds were negative for all subtypes, except for a mallard (*Anas platyrhynchos*) positive for aMPV subtype C. The mallard is a species close to the domestic environment and this finding supports the need for envisaging possible viral passage from wild birds to reared poultry.

### INTRODUZIONE

Il Metapneumovirus aviare (aMPV) è un patogeno comune nell'ambito dell'allevamento di pollo e tacchino e causa perdite economiche, legate al calo della produzione e al suo controllo (Rautenschlein, 2019). È conosciuto come agente di malattia respiratoria nel tacchino, ma può causare anche forme a carico dell'apparato riproduttivo, con calo dell'ovodeposizione e della qualità delle uova in ovaiole e riproduttori, forme complicate da infezioni batteriche secondarie, che possono esitare in manifestazioni conosciute come "Sindrome della testa gonfia" nel pollo (Cecchinato *et al.*, 2016) ed è in grado di causare malattia anche nelle anatre (Brown *et al.*, 2019).

In quanto virus con un genoma a singolo filamento di RNA, è caratterizzato da una notevole variabilità genetica (Cook, 2000), che ha portato all'iniziale distinzione di quattro sottotipi (A-D) (Juhász & Easton, 1994; Seal, 1998; Bayon-Auboyer *et al.*, 2000), sulla base di caratteristiche antigeniche e genetiche. Di questi, il sottotipo D non è più stato identificato, mentre i più diffusi a livello di allevamento sono i sottotipi A e B (Franzo *et al.*, 2020; Mescolini *et al.*, 2021) e il sottotipo C è ampiamente diffuso negli Stati Uniti, sia nella popolazione domestica allevata (Goyal *et al.*, 2003) sia in quella selvatica (Turpin *et al.*, 2008).

Recentemente due nuovi sottotipi sono stati identificati nel parrocchetto (Retallack *et al.*, 2019) e nel gabbiano (Canuti *et al.*, 2019), ma mancano ancora informazioni sulla loro patogenicità e diffusione. La presenza di questo virus nella popolazione selvatica

ne ha suggerito un ruolo di reservoir e di diffusione (Jardine *et al.*, 2018), stimolando la necessità di un monitoraggio, ancor più essenziale dopo la comparsa di nuovi sottotipi emergenti. Questo studio si è avvalso del campionamento effettuato nell'ambito della sorveglianza per l'Influenza aviaria sui volatili selvatici, condotta dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), per effettuare un'indagine biomolecolare per la ricerca dei sottotipi noti di aMPV.

## **MATERIALI E METODI**

I campioni sono stati raccolti durante l'attività di sorveglianza attiva e passiva per l'Influenza aviaria, condotta dall'IZSVe nella zona del Nord-Est Italia. Le matrici campionate consistevano in tamponi orofaringei, tracheali o cloacali, feci o organi come polmoni e reni. I campioni sono stati processati per l'estrazione degli acidi nucleici presso l'IZSVe e le piastre contenenti gli estratti sono state conferite al laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS e conservate a -80°C fino alla processazione. Le informazioni riguardanti data e luogo di campionamento, specie, età e matrice sono state organizzate in un database ed associate agli identificativi dei campioni.

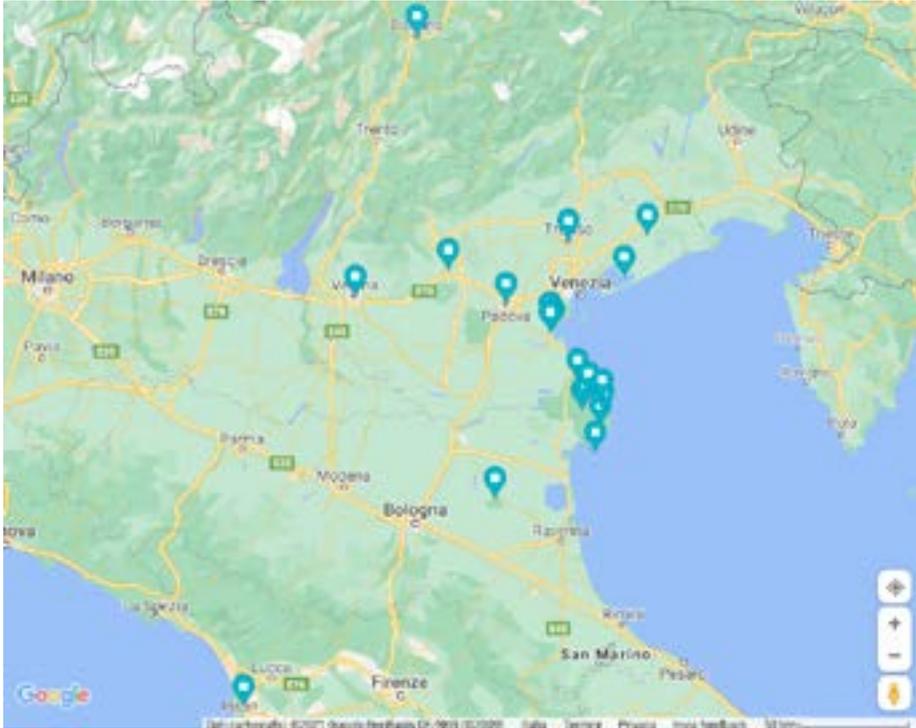
Sono stati selezionati solo gli estratti di matrici come tamponi orofaringei, tracheali e polmoni e sono stati aggregati in pool di 8 campioni secondo la disposizione su piastra. Per la ricerca dei vari sottotipi di aMPV sono state utilizzate due metodiche di multiplex real time RT-PCR eseguite con il kit SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, USA) su termociclatore LightCycler® 96 (Roche, Svizzera). Per la ricerca dei sottotipi A e B è stata utilizzata la metodica descritta da Cecchinato *et al.* (2013) (Cecchinato *et al.*, 2013), mentre per la ricerca del sottotipo C e dei nuovi sottotipi identificati in gabbiano e parrocchetto è stata utilizzata una metodica validata presso il laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS, su di un plasmide contenente le regioni target dei vari sottotipi (primer, probe e protocollo disponibili su richiesta). I campioni facenti parte di pool positivi sono stati analizzati singolarmente con le stesse metodiche per confermare l'eventuale positività e attribuirli al singolo individuo. I campioni positivi sono stati processati con le metodiche disponibili di RT-PCR (Shin, Rajashekara, *et al.*, 2000; Cecchinato *et al.*, 2010) con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase kit (Invitrogen™, USA) su termociclatore Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) e successivo sequenziamento Sanger con i medesimi primer, per ottenere la conferma diagnostica e la caratterizzazione genetica dei ceppi. I cromatogrammi sono stati valutati dal punto di vista qualitativo con il software FinchTV (Geospiza Inc., USA) e assemblati in sequenze consenso con il software ChromasPro 2.1.8 (Technelysium Pty Ltd, Australia). Le sequenze sono state allineate a sequenze di riferimento scaricate da GenBank ed è stato ricostruito un albero filogenetico con metodo Maximum Likelihood utilizzando il software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

## **RISULTATI**

Sono stati ottenuti gli estratti di 1932 campioni, di cui 1761 tamponi tracheali, 160 tamponi orofaringei e 11 aliquote di polmoni. Il campionamento è stato effettuato nel periodo 2018-2021, nelle province di Bolzano (n. 10), Ferrara (n. 47), Pisa (n. 52), Padova (n. 825), Rovigo (n. 713), Treviso (n. 19), Venezia (n. 208), Verona (n. 28), Vicenza (n. 30) (Figura 1). La numerosità degli individui appartenenti alle 32 specie campionate è riportata in Tabella 1.

**Tabella 1:** numerosità dei volatili campionati e specie di appartenenza.

<b>Volatile</b>	<b>Ordine</b>	<b>Specie</b>	<b>N.</b>
Airone guardabuoi	<i>Pelecaniformes</i>	<i>Bubulcus ibis</i>	1
Alzavola comune	<i>Anseriformes</i>	<i>Anas crecca</i>	261
Canapiglia	<i>Anseriformes</i>	<i>Mareca strepera</i>	37
Canapino	<i>Passeriformes</i>	<i>Hippolais polyglotta</i>	8
Cannaiola	<i>Passeriformes</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	41
Cannaiola verdognola	<i>Passeriformes</i>	<i>Acrocephalus palustris</i>	17
Cannareccione	<i>Passeriformes</i>	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	1
Capinera	<i>Passeriformes</i>	<i>Sylvia atricapilla</i>	41
Cinciallegra	<i>Passeriformes</i>	<i>Parus major</i>	6
Codibugnolo	<i>Passeriformes</i>	<i>Aegithalos caudatus</i>	4
Codone comune	<i>Anseriformes</i>	<i>Anas acuta</i>	21
Cormorano	<i>Suliformes</i>	<i>Phalacrocorax carbo</i>	10
Fagiano	<i>Galliformes</i>	<i>Phasianus colchicus</i>	2
Fischione	<i>Anseriformes</i>	<i>Mareca penelope</i>	230
Folaga comune	<i>Gruiformes</i>	<i>Fulica atra</i>	1
Gallinella d'acqua	<i>Gruiformes</i>	<i>Gallinula chloropus</i>	4
Germano reale	<i>Anseriformes</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>	862
Lui piccolo	<i>Passeriformes</i>	<i>Phylloscopus collybita</i>	1
Martin pescatore	<i>Coraciiformes</i>	<i>Alcedo atthis</i>	6
Marzaiola	<i>Anseriformes</i>	<i>Spatula querquedula</i>	256
Merlo	<i>Passeriformes</i>	<i>Turdus merula</i>	6
Mestolone	<i>Anseriformes</i>	<i>Spatula clypeata</i>	70
Moriglione	<i>Anseriformes</i>	<i>Aythya ferina</i>	3
Oca selvatica	<i>Anseriformes</i>	<i>Anser anser</i>	1
Passera d'Italia	<i>Passeriformes</i>	<i>Passer italiae</i>	3
Picchio	<i>Piciformes</i>	<i>Dryocopus martius</i>	1
Picchio verde	<i>Piciformes</i>	<i>Picus viridis</i>	1
Porciglione	<i>Gruiformes</i>	<i>Rallus aquaticus</i>	1
Pettirosso	<i>Passeriformes</i>	<i>Erithacus rubecula</i>	2
Storno	<i>Passeriformes</i>	<i>Sturnus vulgaris</i>	1
Usignolo	<i>Passeriformes</i>	<i>Luscinia megarhynchos</i>	7
Usignolo di fiume	<i>Passeriformes</i>	<i>Cettia cetti</i>	24
Non identificato			2
Totale			1932



**Figura 1:** mappa dei luoghi in cui è stato effettuato il campionamento per aMPV nei volatili selvatici.

Gli estratti sono stati assemblati in 262 pool, risultati tutti negativi per la ricerca dei sottotipi A e B e dei nuovi sottotipi identificati in gabbiano e parrocchetto, permettendo quindi di escludere una prevalenza superiore a 0,15% (IC 95%) assumendo una dimensione della popolazione > 100000.

Un pool è risultato positivo per il sottotipo C e, una volta testati i campioni singolarmente, un solo tampone tracheale di germano reale (*Anas platyrhynchos*) raccolto in provincia di Padova nel 2018 è risultato positivo (0,12%; 95% IC=0,00-0,34%) su un campione di 862 di germani reali testati. L'analisi filogenetica ha rivelato una similarità nucleotidica (98,5-99,0%) del ceppo italiano con dei ceppi di aMPV sottotipo C identificati negli USA in tacchini e oche tra il 1999 e il 2004 (Figura 2).



**Figura 2:** albero filogenetico relativo alle sequenze parziali di gene M dei ceppi disponibili di aMPV sottotipo C, ricostruito con metodo Maximum Likelihood. Il ceppo identificato nel presente studio è evidenziato con un pallino nero.

Nella restante popolazione selvatica è possibile escludere una prevalenza dell'infezione da aMPV sottotipo C superiore a 0,28% (IC 95%).

## DISCUSSIONE

Grazie alla collaborazione con l'IZSVe, è stato possibile ottenere un vasto numero di campioni di volatili selvatici, appartenenti a molte specie diverse, dai quali però non è emersa alcuna positività per aMPV, tranne in un singolo caso di un germano reale positivo per il sottotipo C. L'assenza di positività per i sottotipi più comuni e più diffusi nell'ambito dell'allevamento del pollo e del tacchino rassicura sull'entità del rischio che le specie selvatiche possono costituire per quelle domestiche.

Nel presente studio sono state analizzate diverse specie afferenti ad ordini in cui erano state evidenziate positività per aMPV in letteratura. Il sottotipo C è stato individuato in Passeriformi come passeri, storni e rondini (Shin, Njenga, *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2004), Anseriformi come mestolone comune, marzaiola americana, fischione americano, anatra nera americana, anatra sposa (Jardine *et al.*, 2018), germano reale, oca selvatica (van Boheemen *et al.*, 2012) e oca canadese (Turpin† *et al.*, 2008), in Gruiformi come la folaga americana e Pelicaniformi come l'airone guardabuoi (Turpin† *et al.*, 2008). In altri Anseriformi come la dendrocigna facciabianca (Felippe *et al.*, 2011; Rizotto *et al.*, 2019) era stato individuato il sottotipo B; nell'oca dell'Orinoco (Felippe *et al.*, 2011) e nell'anatra mandarina (Rizotto *et al.*, 2019) il sottotipo A, mentre nel codone guancebianche sono stati rilevati entrambi i sottotipi A e B (Felippe *et al.*, 2011). Per contro, nonostante l'elevata numerosità totale di animali, molte specie sono sottorappresentate e la dimensione campionaria limitata potrebbe aver precluso la possibilità di individuare animali infetti, soprattutto in caso di basse prevalenze come quelle attese per l'infezione da aMPV.

L'utilizzo di strumenti biomolecolari permette inoltre la diagnosi diretta del patogeno e di un'infezione attiva o, al massimo, subclinica, mancando inevitabilmente di identificare animali che siano entrati precedentemente in contatto con il virus. Per avere una descrizione più approfondita dell'epidemiologia di aMPV sarà necessario affiancare agli strumenti molecolari anche indagini sierologiche, per raccogliere inoltre informazioni su quali siano le specie più suscettibili, sul loro ruolo di reservoir e per pianificare lo studio della biologia dell'infezione anche in questi ospiti.

D'altra parte, tra le specie campionate sono assenti gabbiani e parrocchetti, in cui i nuovi sottotipi sono stati identificati e potrebbero essere maggiormente diffusi: l'assenza quindi di questi sottotipi in altre specie non permette di trarre conclusioni in merito alla loro presenza sul territorio italiano, suggerendo quindi l'opportunità di studi dedicati alla ricerca di questi sottotipi in Caradriiformi e Psittaciformi.

La presenza invece di un germano reale positivo per il sottotipo C si affianca al recente ritrovamento di un gruppo di germani allevati risultati positivi sierologicamente per il sottotipo C (Legnardi *et al.*, 2021), stimolando quindi una certa attenzione nei confronti di questa specie, dalla riprovata suscettibilità e che potrebbe fungere da nesso epidemiologico tra la popolazione domestica e quella selvatica, in entrambe le direzioni. Il ceppo identificato nel germano fa parte di un cluster in cui sono presenti ceppi americani di tacchini e oche, mentre è filogeneticamente distante (96,4% di similarità nucleotidica) rispetto all'unico altro ceppo di aMPV sottotipo C italiano identificato finora in un fischione (Silveira *et al.*, 2018), che a sua volta era parte di un cluster con sequenze americane e una sequenza francese. Questa eterogeneità, per quanto inferiore

essendo valutata sul gene M caratterizzato da minore variabilità rispetto ad altre regioni genomiche, supporta ancora una volta le considerazioni sull'esistenza di cluster virali distinti all'interno del sottotipo C (Toquin *et al.*, 2006), ma sembra indebolire la base geografica di questa suddivisione, anche se la mancanza di sequenze europee di aMPV sottotipo C non permette una ricostruzione dettagliata delle relazioni filogenetiche all'interno di questo sottotipo.

## CONCLUSIONI

La limitata circolazione dei sottotipi più diffusi, A e B, e del sottotipo C di aMPV nella popolazione selvatica circoscrive quindi il rischio di contaminazione per la specie domestica. La conferma della presenza sul territorio del sottotipo C, apparentemente non ancora entrato in allevamento o quantomeno non ancora identificato, sottolinea invece l'esigenza di approfondire il monitoraggio delle specie selvatiche, affinando le conoscenze sulla circolazione di questo sottotipo e preparando degli strumenti diagnostici adeguati, qualora facesse il suo ingresso in allevamento. Infatti, nel caso di sintomatologia suggestiva di infezione da aMPV in allevamento, ma in assenza di positività ai comuni metodi diagnostici, potrebbe essere utile ricorrere ad esami sierologici che possano mettere in luce un'infezione pregressa da aMPV ed indicare quindi la possibile presenza di un sottotipo non rilevato, per ragioni di specificità diagnostica limitata ai sottotipi più diffusi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bayon-Auboyer, M.H., Arnauld, C., Toquin, D. & Etteradossi, N. (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. *Journal of General Virology*, *81*, 2723–2733.
2. Bennett, R.S., Nezworski, J., Velayudhan, B.T., Nagaraja, K. V., Zeman, D.H., Dyer, N., Graham, T., Lauer, D.C., Njenga, M.K. & Halvorson, D.A. (2004). Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Diseases*, *48*, 902–908.
3. Brown, P.A., Allée, C., Courtillon, C., Szerman, N., Lemaitre, E., Toquin, D., Mangart, J.-M.M., Amelot, M. & Etteradossi, N. (2019). Host specificity of avian metapneumoviruses. *Avian Pathology*, *48*, 311–318.
4. Canuti, M., Kroyer, A.N.K., Ojkic, D., Whitney, H.G., Robertson, G.J. & Lang, A.S. (2019). Discovery and characterization of novel rna viruses in aquatic North American wild birds. *Viruses*, *11*.
5. Cecchinato, M., Catelli, E., Lupini, C., Ricchizzi, E., Clubbe, J., Battilani, M. & Naylor, C.J. (2010). Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. *Veterinary Microbiology*, *146*, 24–34.
6. Cecchinato, M., Ferreira, H.L., Munir, M. & Catelli, E. (2016). Avian Metapneumovirus. *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Molecular Epidemiology and Control* (CAB International., Vol. 2, pp. 127–143).
7. Cecchinato, M., Lupini, C., Munoz Pogoreltseva, O.S., Listorti, V., Mondin, A., Drigo, M. & Catelli, E. (2013). Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian Pathology*, *42*, 283–289.

8. Cook, J.K.A. (2000, September 1). Avian Pneumovirus Infections of Turkeys and Chickens. *Veterinary Journal*.
9. Felipe, P.A., da Silva, L.H.A., dos Santos, M.B., Sakata, S.T. & Arns, C.W. (2011). Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. *Avian Pathology*, *40*, 445–452.
10. Franzo, G., Legnardi, M., Mescolini, G., Tucciarone, C.M., Lupini, C., Quaglia, G., Catelli, E. & Cecchinato, M. (2020). Avian Metapneumovirus subtype B around Europe: a phylodynamic reconstruction. *Veterinary Research*, *51*, 1–10.
11. Goyal, S.M., Lauer, D., Friendshuh, K. & Halvorson, D.A. (2003). Seroprevalence of avian pneumovirus in Minnesota turkeys. *Avian Diseases*, *47*, 700–706.
12. Jardine, C.M., Parmley, E.J., Buchanan, T., Nituch, L. & Ojkic, D. (2018). Avian metapneumovirus subtype C in Wild Waterfowl in Ontario, Canada. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*, 1098–1102.
13. 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.
14. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*, 1547–1549.
15. Legnardi, M., Allée, C., Franzo, G., Cecchinato, M. & Brown, P. (2021). Research Note: Detection of Avian metapneumovirus subgroup C specific antibodies in a mallard flock in Italy. *Poultry Science*, *100*, 101186.
16. Mescolini, G., Lupini, C., Franzo, G., Quaglia, G., Legnardi, M., Cecchinato, M., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Turblin, V., Biarnés, M., Tatone, F., Falchieri, M. & Catelli, E. (2021). What is new on molecular characteristics of Avian metapneumovirus strains circulating in Europe? *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*, 1314–1322.
17. Rautenschlein, S. (2019). Avian Metapneumovirus. *Diseases of Poultry* (14th ed., pp. 135–143).
18. Retallack, H., Clubb, S. & DeRisi, J.L. (2019). Genome Sequence of a Divergent Avian Metapneumovirus from a Monk Parakeet ( *Myiopsitta monachus* ). *Microbiology Resource Announcements*, *8*.
19. Rizotto, L.S., Simão, R.M., Scagion, G.P., Simasaki, A.A., Caserta, L.C., Benassi, J.C., Arns, C.W. & Ferreira, H.L. (2019). Detection of avian metapneumovirus subtype A from wild birds in the State of São Paulo, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *39*, 209–213.
20. Seal, B.S. (1998). Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Research*, *58*, 45–52.
21. Shin, H.J., Njenga, M.K., McComb, B., Halvorson, D.A. & Nagaraja, K. V. (2000). Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*, 4282–4284.
22. Shin, H.J., Rajashekara, G., Jirjis, F.F., Shaw, D.P., Goyal, S.M., Halvorson, D.A. & Nagaraja, K. V. (2000). Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Archives of Virology*, *145*, 1239–1246.

23. Silveira, F., Lupini, C., Cecchinato, M., Giovanni, F., Tucciarone, C.M., Mescolini, G., Felice, V., Martini, M., Terregino, C. & Catelli, E. (2018). Evidenza di circolazione di Metapneumovirus aviare sottotipo C in un fischione (*Anas penelope*) campionato in Nord Italia. *III Simposio Scientifico SIPA* (pp. 167–172).
24. Toquin, D., Guionie, O., Jestin, V., Zwingelstein, F., Allee, C. & Etteradossi, N. (2006). European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*, *32*, 97–103.
25. Turpin†, E.A., Stallknecht, D.E., Slemons, R.D., Zsak, L. & Swayne, D.E. (2008). Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. *Avian Pathology*, *37*, 343–351.
26. van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Verhagen, J.H., Osterhaus, A.D.M.E., Pas, S.D., Herfst, S. & Fouchier, R.A.M. (2012). A family-wide rt-pcr assay for detection of paramyxoviruses and application to a large-scale surveillance study. *PLoS ONE*, *7*.