

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Epidemiologia e Controllo delle Zoonosi

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: VET 05

**EVOLUZIONE GENOMICA ED ANTIGENICA DI
*METAPNEUMOVIRUS AVIARE***

Presentata da: Caterina Lupini

Coordinatore Dottorato:

Prof. Giovanni Poglayen

Relatore:

Prof.ssa Elena Catelli

Esame finale anno 2009

INDICE

INTRODUZIONE	5
PARTE GENERALE INFEZIONI DA <i>METAPNEUMOVIRUS AVIARE</i>	
1. EZIOLOGIA	9
1.1. Tassonomia	9
1.2. Morfologia	10
1.3. Proteine virali	11
1.4. Tipizzazione virale	12
1.5. Proprietà chimico-fisiche	15
2. EPIDEMIOLOGIA	17
2.1. Specie sensibili	17
2.2. Ruolo dei selvatici	18
2.3. Distribuzione geografica	20
2.4. <i>Metapneumovirus</i> aviare in Italia	21
2.5. Modalità di trasmissione	23
3. PATOGENESI	24
3.1. Replicazione e persistenza del virus nei tessuti	24
4. SINTOMATOLOGIA	29
5. LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE	32
5.1. Lesioni Macroscopiche	32
5.2. Lesioni Microscopiche	33
6. RISPOSTA IMMUNITARIA	34
7. DIAGNOSI	36

7.1. Diagnosi clinica	36
7.2. Isolamento virale	36
7.3. Ricerca dell'antigene virale	38
7.3.1. <i>Immunofluorescenza ed immunoperossidasi</i>	38
7.3.2. <i>Polimerase Chain Reaction (PCR)</i>	38
7.4. Diagnosi sierologica	40
8. CONTROLLO DELLA MALATTIA	43

PARTE SPERIMENTALE

STUDIO A: STUDI LONGITUDINALI DI CAMPO

A.1. INTRODUZIONE	51
A.2. MATERIALI E METODI	53
A.2.1. Gruppi oggetto di indagine e campionamento	53
A.2.2. RT nested-PCR sottotipo A e B specifica per diagnosi e tipizzazione di AMPV	53
A.2.2.a <i>Estrazione dell'RNA virale</i>	53
A.2.2.b <i>RT nested-PCR</i>	55
A.2.3. Isolamento AMPV su colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC)	57
A.2.3.a <i>Preparazione del terreno di coltura Minimum Essential Medium Free Serum (MEM-SF)</i>	57
A.2.3.b <i>Preparazione delle TOC</i>	58
A.2.3.c <i>Inoculazione TOC</i>	59
A.2.4. Differenziazione fra ceppi di campo e vaccinali	60
A.2.4.a <i>Estrazione dell'RNA ed RT PCR</i>	60
A.2.4.b <i>Sequenziamento ed analisi filogenetica</i>	60
A.3. RISULTATI	62

STUDIO B: EVOLUZIONE GENOMICA DI AMPV NEL PERIODO 1986-2007

B.1. INTRODUZIONE	64
-------------------	----

B.2. MATERIALI E METODI	65
B.2.1. Ceppi virali	65
B.2.2. Analisi di sequenza dei geni G ed F	66
<i>B.2.2.a. Estrazione dell'RNA ed RT PCR</i>	66
<i>B.2.2.b. Sequenziamento ed analisi filogenetica</i>	67
<i>B.2.2.c. Numeri di accesso (n.a.) alle sequenze nucleotidiche</i>	68
B.2.3. Analisi di sequenza del genoma completo di AMPV	69
<i>B.2.3.a. Estrazione dell'RNA ed RT PCR</i>	69
<i>B.2.3.b. Sequenziamento ed analisi filogenetica</i>	69

B.3. RISULTATI	70
B.3.1. Analisi di sequenza del gene F	70
B.3.2. Analisi di sequenza del gene G	71
B.3.3. Analisi di sequenza del genoma completo	77

STUDIO C: ELUSIONE DELLA PROTEZIONE VACCINALE

C.1. INTRODUZIONE	81
C.2. MATERIALI E METODI	82
C.2.1. Vaccino AMPV	82
C.2.2. Ceppi virali	82
C.2.3. Tacchini	82
C.2.4. Piano sperimentale	82
C.2.5. Misurazione della sintomatologia clinica	83
C.2.6. RT nested-PCR per AMPV	84
C.2.7. Analisi statistica	84
C.3. RISULTATI	85
C.3.1. Sintomatologia clinica	85
C.3.2. Eliminazione virale post-challenge	91
C.3.3. Valutazione statistica della sintomatologia clinica e della eliminazione virale	93

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	97
----------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFIA	101
---------------------	------------

INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus* aviare (AMPV) è noto come agente eziologico della Rinotracheite del Tacchino (TRT), un'infezione del tratto respiratorio superiore caratterizzata da elevata morbilità e da mortalità variabile, dovuta comunemente a complicazioni batteriche secondarie. Nei riproduttori è in grado inoltre di causare una riduzione della produzione e della qualità delle uova. Oltre al tacchino, sono sensibili all'infezione anche altre specie aviari tra cui principalmente il pollo, dove è coinvolto nella eziologia della Sindrome della Testa Gonfia (SHS). Sono stati sino ad ora identificati, in base alle sequenze nucleotidiche di AMPV, quattro sottotipi virali denominati A, B, C e D.

La TRT compare per la prima volta alla fine degli anni '70 ed attualmente è presente, ad eccezione dell'Oceania, in tutti i continenti, dove rappresenta una delle principali patologie del tacchino. In Italia l'infezione è stata osservata a partire dal 1987 e successivamente si è diffusa ed è endemizzata nelle regioni geografiche a maggior vocazione avicola quali Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna, acquisendo notevole importanza fra le problematiche sanitarie del tacchino. Per la profilassi della TRT si è precocemente ricorso all'impiego di vaccini; fra quelli disponibili nel nostro Paese quello maggiormente utilizzato appartiene al sottotipo B. Nei primi anni, allo scopo di determinare la migliore modalità di somministrazione, il vaccino fu impiegato a "spot", per via oculare o spray, a dosi variabili e non standardizzate, a seconda della percezione del problema. Solo dalla fine del 2001, la vaccinazione ha cominciato ad essere praticata a tappeto, ad un giorno di vita, via spray, in incubatoio, ha tenuto in gran parte la malattia sotto controllo.

Tuttavia dati epidemiologici recenti hanno mostrato come si evidenzino ancora con una certa frequenza focolai di malattia in animali vaccinati. Infatti, nonostante siano negli anni diminuite complessivamente le positività per AMPV, si è verificato un aumento del numero dei focolai in età avanzata (43-90 giorni di età). Ciò può essere imputato a diverse cause tra cui vaccinazione mal praticata, scarsa durata dell'immunità, incompleta protezione crociata fra sottotipi o

riacquisizione di patogenicità del vaccino stesso. Tali cause però non spiegano esaurientemente l'incremento di focolai di TRT in animali vaccinati correttamente e con vaccino del medesimo sottotipo virale causa del focolaio.

Il lavoro riportato nella presente tesi è nato con lo scopo di approfondire le cause della incompleta protezione prendendo in considerazione, fra le possibili ipotesi, l'elusione della risposta immunitaria vaccinale dovuta ad evoluzione di AMPV dal punto di vista genomico ed antigenico. L'ipotesi è stata svolta ed approfondita in tre studi.

Nel primo si è presa in considerazione la dinamica dell'infezione da AMPV in gruppi di tacchini vaccinati, mediante indagini longitudinali diagnostiche. Quindi, nel secondo studio, per identificare mutazioni in regioni antigeniche chiave, è stata svolta l'analisi filogenetica dei geni codificanti per le proteine di adesione (G) e fusione (F) di ceppi Italiani ed Europei di AMPV isolati dal 1986 al 2007 e dell'intero genoma di due ceppi rappresentativi e del vaccino. Infine è stato eseguito uno studio di cross protezione *in vivo* sottoponendo tacchinotti vaccinati a challenge con AMPV isolato nel 1987 o nel 2004, per verificare se i cambiamenti riscontrati siano stati sufficienti a permettere al virus l'elusione della risposta immunitaria indotta dal vaccino usato per 20 anni nell'area geografica considerata.

PARTE GENERALE

INFEZIONI DA *METAPNEUMOVIRUS AVIARE*

1. EZIOLOGIA

1.1. TASSONOMIA

Il *Metapneumovirus* aviare (AMPV), un tempo classificato come *Pneumovirus* aviare, appartiene alla famiglia *Paramyxoviridae*, che raggruppa virus a RNA a singolo filamento non segmentato, a polarità negativa. Questi virus sono pleomorfi, con nucleocapside a simmetria elicoidale e provvisti di envelope esterno envelope.

Alla famiglia *Paramyxoviridae* appartengono due sottofamiglie:

1) *Paramyxovirinae*, a cui, fra gli altri, appartiene il genere *Avulavirus* che comprende l'agente eziologico della Malattia di Newcastle (*Paramyxovirus* tipo I) e gli altri *Paramyxovirus* aviari;

2) *Pneumovirinae*, a cui appartengono due generi: *Pneumovirus* e *Metapneumovirus*. Il primo raggruppa il virus respiratorio sinciziale umano (HRSV), bovino (BRSV), e ovicaprino (ORSV), oltre al virus della polmonite del topo (MPV), mentre nel secondo genere troviamo il *Metapneumovirus* aviare (AMPV) (Pringle, 1998) e umano (HMPV), evidenziato per la prima volta nel 2001 da bambini colpiti da forma respiratoria (Van den Hoogen *et al.*, 2001).

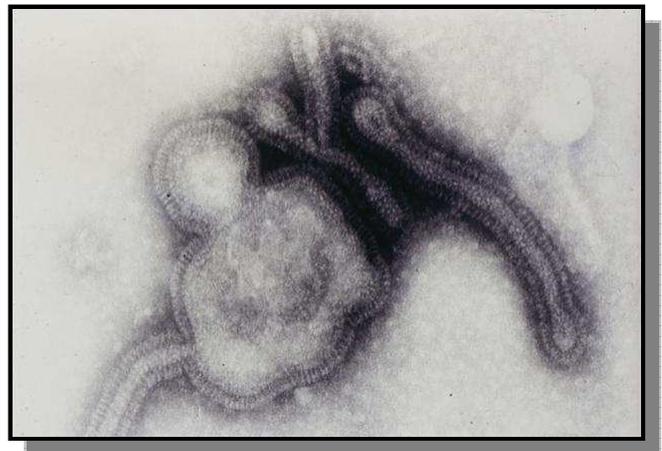


Figura 1. Immagine al microscopio elettronico del *Metapneumovirus* aviare (gentilmente da R.C. Jones).

1.2. MORFOLOGIA

Alla microscopia elettronica si evidenziano particelle virali ad elevato pleomorfismo, che a volte si presentano sferiche, ma possono assumere forme bizzarre con lunghe proiezioni filamentose (Figura 1). Solitamente si osservano strutture rotondegianti con dimensioni di diametro che variano dai 50 ai 200 nm, anche se occasionalmente sono stati segnalati virioni con diametro superiore ai 500 nm. Non sono note differenze funzionali legate alla struttura del virione ma quelle osservate potrebbero essere legate al substrato colturale utilizzato (Easton *et al.*, 2004). In particolare, nei preparati derivati dalle colture di anelli tracheali di embrioni di pollo possono essere presenti delle forme filamentose di 80-100 nm di diametro e più di 1000 nm di lunghezza.

Sull'envelope sono presenti evidenti proiezioni superficiali, i cosiddetti *spikes*, di lunghezze comprese fra 13 e 15 nm. Il nucleocapside, a simmetria elicoidale, presenta un diametro di 14 nm e un'altezza di 7 nm per spira (Collins e Gough, 1988). Tali valori consentono di differenziare fra le sottofamiglie *Pneumovirinae* e *Paramyxovirinae*, i virus appartenenti a quest'ultimo gruppo infatti mostrano un diametro maggiore (18 nm) ed una altezza inferiore (Collins e Gough, 1988). Infine AMPV non possiede né emoagglutinine, non presentando capacità emoagglutinine confronti di eritrociti aviari e di mammiferi (Wyeth *et al.*, 1986; Buys *et al.*, 1989a), né neuroaminidasi.

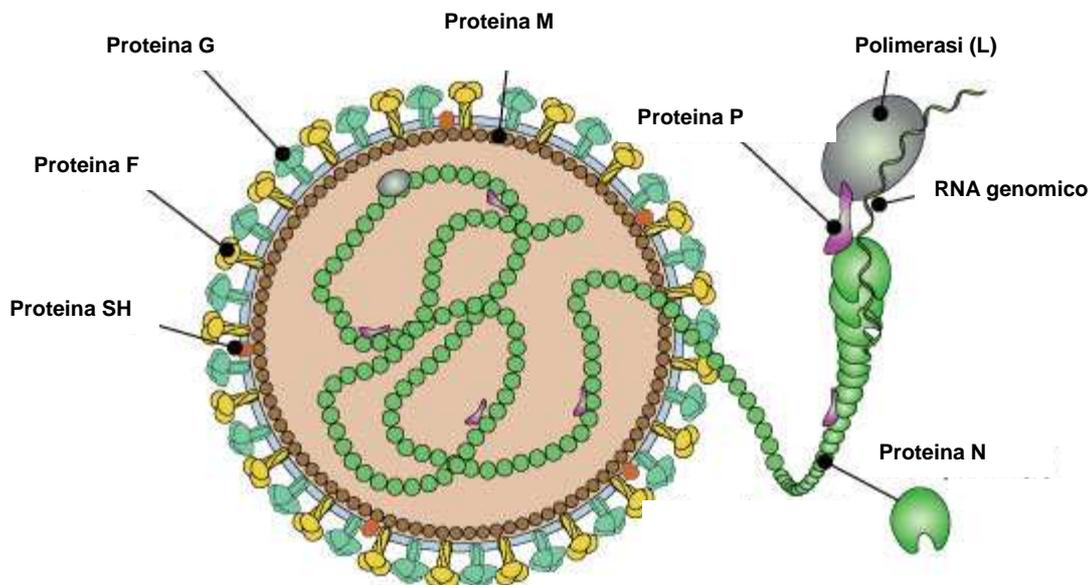


Figura 2. Rappresentazione schematica di un metapneumovirus. Il genoma ad RNA rappresentato a destra mostra l'associazione con le nucleoproteine (<http://www.expasy.org/viralzone/html>)

1.3 PROTEINE VIRALI

Le proteine che costituiscono la struttura del virione di AMPV sono rappresentate schematicamente in figura 2.

La proteina strutturale del nucleocapside (proteina N), con peso di 38-43 kDa, è responsabile della struttura elicoidale dell'RNA: il dominio carbossiterminale interagisce direttamente col genoma e l'aminotermine si pone sulla superficie esterna del nucleocapside, rendendolo flessibile (Easton *et al.*, 2004).

Le proteine *large polymerase* (proteina L) e *phosphoprotein* (proteina P) rappresentano le proteine ausiliari del nucleocapside e sono implicate nei processi di sintesi e trascrizione; la proteina L è una polimerasi RNA-dipendente responsabile della sintesi dell'RNA messaggero, di intermedi replicativi e dell'RNA genomico della progenie virale (Broor e Bharaj, 2007).

La proteina di matrice (proteina M) (30-35 kDa) è associata con la membrana interna lipidica delle cellule infettate e media l'assemblaggio fra il complesso del nucleocapside e l'envelope nascente.

Il gene che codifica per le proteine seconda di matrice (22 kDa) contiene due unità trascrizionali *overlapping*,. la prima (proteina M2-1) si pensa funzioni come fattore di elongazione durante lo step della trascrizione; la proteina M2-2 invece si pensa che agisca nel passaggio dalla fase replicativa all'assemblaggio, prima del rilascio del virione. Infine abbiamo le tre glicoproteine dell'envelope: inframezzate ai lipidi di origine cellulare troviamo le proteine di attacco (proteina G), di fusione (proteina F) e *small hydrophobic* (proteina SH); le prime due si trovano in superficie e rappresentano i principali determinanti antigenici, mentre la terza è integrata nell'envelope. La proteina G permette l'adsorbimento del virus alla cellula, mentre la F garantisce la fusione dell'envelope con la membrana cellulare, determinando la liberazione del nucleocapside nel citoplasma (Broor e Bharaj, 2007); la funzione della proteina SH è meno nota, anche se recenti studi suggeriscono, come questa favorisca la sopravvivenza *in vitro* di AMPV ipotizzando un ruolo importante nel processo di fusione virale con la cellula (Naylor *et al.*, 2004; Ling *et al.*, 2008).

La prima classificazione degli isolati europei di AMPV risale alla fine degli anni '80 ed è basata sulla determinazione dei diversi polipeptidi virali e dei rispettivi pesi molecolari, mediante la tecnica di elettroforesi in gel di polyacrylamide (PAGE) (Cavanagh e Barrett, 1988; Collins e Gough, 1988; Ling e Pringle, 1988). Questi dati hanno messo in evidenza una grossa somiglianza, anche sotto il profilo molecolare, tra AMPV e i virus respiratori sinciziali (RSV) umano e bovino. Nel corso degli anni '90 è stata determinata la sequenza dei geni che codificano per tutte le proteine di AMPV. Il gene F, preposto alla sintesi della proteina di fusione, è stato studiato per primo (Yu *et al.*, 1991). In seguito sono

stati analizzati i geni che codificano per le altre proteine: la proteina M (Yu *et al.*, 1992;), la M2 (Yu *et al.*, 1992), le proteine codificate dal gene SH (Ling *et al.*, 1992), la G (Juhász e Easton, 1994; Ling *et al.*, 1992), la fosfoproteina P (Ling *et al.*, 1995), la proteina N (Li *et al.*, 1996; Randhawa *et al.*, 1996) e la polimerasi L (Randhawa *et al.*, 1996). Attraverso questi studi è stato osservato che la sequenza dei diversi geni è molto simile a quella dei virus sinciziali respiratori umano e bovino. L'ordine in cui i diversi geni sono distribuiti nel genoma virale è, però, diverso in AMPV (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') rispetto ai virus respiratori sinciziali dei mammiferi (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5'), in quanto, nel primo, i geni SH e G sono localizzati in posizione 5' rispetto al gene M2 (Ling *et al.*, 1992) e i geni NS1 e NS2 sono assenti (Randhawa *et al.*, 1997). Quest'ultima osservazione, associata al fatto che il gene L di AMPV è più piccolo rispetto a quello dei virus sinciziali respiratori dei mammiferi, spiega perché il *metapneumovirus* aviario ha un genoma di sole 13,3 kb (Randhawa *et al.*, 1996). Proprio per queste differenze AMPV è stato recentemente classificato come appartenente al nuovo genere *Metapneumovirus* insieme al *Metapneumovirus* umano (Pringle, 1998).

1.4 TIPIZZAZIONE VIRALE

Baxter-Jones *et al.* (1986) furono i primi a valutare, mediante prove di immunofluorescenza indiretta, sieroneutralizzazione ed ELISA eseguite con sieri policlonali, l'esistenza di possibili differenze antigeniche tra i diversi ceppi virali fino ad allora isolati. Per mezzo di queste ricerche, eseguite su tre ceppi inglesi isolati nei tacchini, fu evidenziato che i virus erano molto simili tra loro. Anche Collins e Gough (1988), analizzando due ceppi inglesi e uno francese con diversi test immunologici, giunsero allo stesso risultato. Fu quindi stabilito che AMPV comprendeva un solo sierotipo.

In seguito, mediante il test di neutralizzazione con anticorpi monoclonali in grado di riconoscere la glicoproteina G, sono state messe in evidenza alcune variazioni antigeniche significative tra ceppi provenienti da diverse aree geografiche (Hafez, 1992; Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993a). In particolare, Cook *et al.* (1993) hanno evidenziato un'elevata analogia tra il virus isolato in Sud Africa nel 1978 e i ceppi isolati in Gran Bretagna tra il 1985 e il 1990, e differenze abbastanza evidenti tra questi e un ceppo isolato in Francia nel 1986. Anche Collins *et al.* (1993) hanno osservato differenze antigeniche tra i ceppi inglesi e quelli continentali. Infatti, paragonando i virus isolati in diversi stati europei, si vide che quelli inglesi costituivano un gruppo distinto dai ceppi virali provenienti dall'Italia, dalla Spagna e dall'Ungheria. In contrasto con Cook *et al.* (1993a) però, il ceppo francese del 1986 fu considerato molto simile ai virus britannici.

Questi risultati furono confermati successivamente dall'analisi della sequenza nucleotidica ed amminoacidica della glicoproteina G (Juhasz e Easton, 1994). La proteina G è stata una delle prime proteine ad essere studiata perché, insieme alla proteina F, è uno dei maggiori determinanti antigenici (Yu *et al.*, 1994), e rappresenta il maggior target per gli anticorpi neutralizzanti sia di AMPV che dei virus respiratori sinciziali (Bayon-Abouyer *et al.*, 2000). Il virus respiratorio sinciziale umano, in base a differenze antigeniche evidenziate dal test di neutralizzazione con anticorpi monoclonali, e a differenze nella sequenza del gene G, è stato suddiviso in due sottogruppi, A e B (Anderson *et al.*, 1985; Mufson *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 1987; Cane *et al.*, 1991; Sullender *et al.*, 1991). Analogamente Juhasz e Easton (1994), studiando la sequenza nucleotidica di cinque ceppi virali isolati in Europa, hanno dimostrato l'esistenza di due diversi sottotipi virali: il sottotipo A, che comprende i ceppi virali isolati in Gran Bretagna e in Francia fino agli anni '90, ed il sottotipo B cui appartengono i ceppi isolati in Italia, Spagna e Ungheria. La proteina G presenta un 98,5-99,7% di similarità amminoacidica nell'ambito dello stesso sottotipo, mentre tra i diversi sottotipi il livello di identità è in media solo del 38%. È stato comunque evidenziato che, nonostante una così elevata differenza nella composizione delle catene proteiche, la conformazione strutturale delle due proteine G sembra essere mantenuta (Juhasz e Easton, 1994). Naylor *et al.* (1997a), mediante un protocollo di PCR in grado di discriminare il sottotipo A dal sottotipo B, hanno infine dimostrato che il ceppo isolato in Francia nel 1986 e quelli degli anni successivi sono da considerare di tipo B e non, come indicato sia da Juhasz e Easton (1994) che da Collins *et al.* (1993a), di tipo A. Per diversi anni si è creduto che il sottotipo A fosse presente solo in Gran Bretagna e in Sud Africa, mentre il sottotipo B circolasse solo in Europa continentale. Studi recenti, invece, hanno dimostrato la presenza del sottotipo B nel Regno Unito (Naylor *et al.*, 1997a) e del sottotipo A in Europa continentale: infatti, Hafez *et al.* (2000), mediante l'applicazione di un protocollo di Nested RT-PCR su ceppi isolati in Germania nel corso degli anni '80, hanno dimostrato che alcuni di essi appartenevano al sottotipo A; inoltre, Van de Zande *et al.* (1998) hanno identificato entrambi i sottotipi in allevamenti di polli in Belgio. Ulteriori informazioni riguardo all'antigenicità di AMPV sono state acquisite dal confronto della sequenza amminoacidica della glicoproteina F del sottotipo A con quella del B (Naylor *et al.*, 1998). Le due catene proteiche sono costituite dallo stesso numero di amminoacidi che si susseguono con un ordine che è identico per l'83% nei due sottotipi. Più precisamente, i domini ectopici delle due proteine hanno una identità amminoacidica pari al 90%, al contrario i domini idrofobici, transmembranari e citoplasmatici, si differenziano in modo molto più marcato tra A e B, con un'identità rispettivamente del 30% e del 48%.

Più recentemente, negli Stati Uniti, è emerso un terzo sottotipo di AMPV, denominato sottotipo C (Senne *et al.*, 1997). Questo evento ha rappresentato la comparsa del AMPV nel Nord America, area precedentemente ritenuta libera dall'infezione (Seal, 1998; Cook *et al.*, 1999). Tale virus è stato inizialmente isolato da tacchini in Colorado e per questo definito isolato Colorado. Qui è stato poi eradicato ma continua a essere causa di malattia nei tacchini nello stato del Minnesota. Questo ceppo è morfologicamente molto simile ai sottotipi A e B, ma non è neutralizzato né da sieri monospecifici anti-A e anti-B, né dagli anticorpi monoclonali specifici per la glicoproteina G che riconoscono e differenziano i sottogruppi A e B (Cook *et al.*, 1999). Comunque, è parzialmente neutralizzato da un siero iperimmune del sottogruppo A (Cook, 2000a), e il primo isolato è stato parzialmente identificato mediante un'immunofluorescenza indiretta allestita con un siero iperimmune prodotto verso il sottogruppo A (Cook *et al.*, 1999). Studi molecolari hanno poi confermato queste differenze. Il primo gene di AMPV ceppo Colorado che sia stato amplificato e sequenziato è quello che codifica per la proteina di matrice. Questo studio, insieme all'analisi della sequenza amminoacidica della proteina M, ha evidenziato che il ceppo Colorado si può distinguere dai sottotipi europei. Infatti, mentre la sequenza amminoacidica della proteina M dei sottotipi A e B è identica per l'89%, il ceppo Colorado mostra un livello di identità amminoacidica con il sottotipo A e B rispettivamente del 78% e del 77% (Seal, 1998).

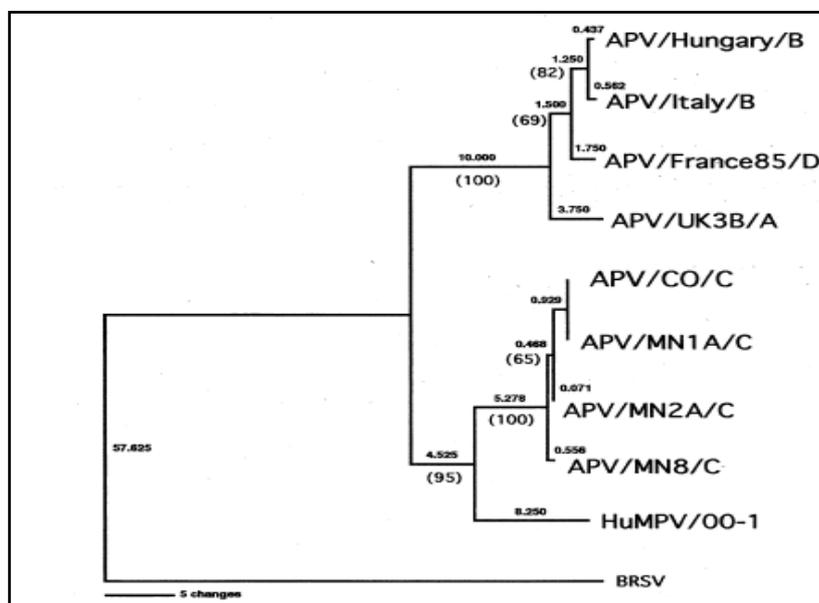


Figura 3. Analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche di parte del gene F di alcuni AMPV. Si osserva come il sottotipo A (APV/A), B (APV/B) e D (APV/D) siano maggiormente correlati tra loro rispetto al sottotipo C (APV/C) più vicino filogeneticamente al *Metapneumovirus* umano (Njienga *et al.*, 2003).

Più recentemente anche il gene F e la relativa proteina sono stati studiati. Confrontando la sequenza amminoacidica della glicoproteina F del ceppo Colorado con quella dei sottotipi A e B, è stata dimostrata un'identità pari al 71,5%, invece dell'83%, osservata tra i sottotipi europei (Seal *et al.*, 2000). Da questi studi è emerso che i ceppi che circolano in America sono filogeneticamente separati dai sottotipi A e B, e di conseguenza è stato infatti identificato un nuovo sottotipo di AMPV, definito sottotipo C (Seal, 2000).

Infine, Bayon-Abuboyer *et al.* (1999) hanno scoperto che due ceppi isolati in Francia nel 1985 differiscono dai sottotipi A e B, tanto da definirli ceppi non-A/non-B, ma anche dal sottotipo C (Toquin *et al.*, 2000). Infatti, l'applicazione di test ELISA allestiti con antigeni del sottotipo A e B ha evidenziato che i due ceppi Francesi non sono antigenicamente correlati a questi due sottotipi (Bayon-Auboyer *et al.*, 1999; Toquin *et al.*, 2000). La sequenziatura dei geni F, G ed L dei due ceppi ha poi pienamente confermato questa ipotesi (Bayon-Auboyer *et al.*, 2000). Studi sulla sequenza amminoacidica della proteina G hanno dimostrato un'identità tra i due ceppi francesi e i sottotipi A e B pari al 31%, che giustifica la proposta di considerare questi due ceppi appartenenti a un nuovo sottotipo (sottotipo D). L'analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche di parte del gene F dei quattro sottotipi di AMPV ha messo in evidenza come i sottotipi A, B e D siano tra loro maggiormente correlati rispetto al sottotipo C che risulta essere più vicino filogeneticamente al *Metapneumovirus* umano (Shin *et al.*, 2002) (figura 3).

1.5. PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE

Studi effettuati sui sottotipi A e B hanno dimostrato che il virus è stabile ad un intervallo di pH compreso tra 3 e 9, viene inattivato ad una temperatura di 56°C in 30 minuti ed è sensibile ai solventi lipidici quali l'etere e il cloroformio, in quanto dotato di envelope (Collins *et al.*, 1986). Diverse sostanze comunemente usate come disinfettanti, a base di aldeidi, alcoli, fenoli e acidi organici sono in grado di inattivare il virus (Hafez e Arns, 1991). È stato riportato inoltre che trattamenti della durata di 5 secondi con forno a microonde e di 20 minuti in autoclave distruggono il virus, permettendo comunque la rilevazione dell'acido nucleico con tecnica PCR (Elhafi *et al.*, 2004)

Negli Stati Uniti è stata studiata la sensibilità del sottotipo C agli agenti chimico-fisici. Il virus è in grado di sopravvivere a temperature comprese tra -70°C e -20°C per più di 26 settimane, a 4°C meno di 12 settimane, a 20°C meno di 4 settimane, a 37°C per 48 ore e a 50°C meno di 6 ore. Variazioni di pH comprese tra 5 e 9 non alterano il titolo virale. I sali quaternari d'ammonio, l'etanolo, gli iodofori e i derivati del fenolo sono attivi nei confronti del virus. Dopo essiccamento a temperatura ambiente, il virus è rimasto vitale per 7 giorni

(Townsend *et al.*, 2000). Studi condotti da Velayudhan *et al.* (2003), sempre su AMPV-C, hanno evidenziato come sia possibile rilevare la presenza del virus nella lettiera stoccata a 8°C per 90 giorni mediante RT-PCR e, con l'isolamento virale, per 30 giorni. Quando la lettiera viene stoccata a temperatura ambiente il virus può essere evidenziato fino a 30 giorni con la RT-PCR e 3 giorni con l'isolamento virale. Inoltre Tiwari *et al.* nel 2006(a) hanno valutato la resistenza virale su differenti superfici, dimostrando una maggior sopravvivenza sulle superfici non porose, rispetto a quelle porose. In particolare è stato possibile mettere in evidenza il virus, a vari titoli, dopo essiccazione delle superfici, fino a 24h su legno e cotone, fino a 72h su acciaio, lattice, piastrelle, stivali di gomma, gomma da pneumatici, piastrelle e guscio d'uovo e fino a 6 giorni su piume e cartone portauova. È stata anche verificata la sopravvivenza del virus in terreno di coltura per 15 giorni a temperatura ambiente .

2. EPIDEMIOLOGIA

2.1 SPECIE SENSIBILI

Il tacchino e il pollo sono considerati ospiti naturali di *Metapneumovirus* aviare. Il tacchino è stata la prima specie in cui è stata osservata la malattia (Buys e Du Preez, 1980), ed è senza dubbio l'animale più sensibile, tanto che AMPV viene anche chiamato comunemente virus della Rinotracheite Infettiva del Tacchino (Turkey Rhinotracheitis Virus -TRTV). Nel pollo è responsabile di forme respiratorie più lievi che possono eventualmente esitare nella Sindrome della testa gonfia (SHS), patologia multifattoriale in cui è essenziale la presenza di *Escherichia coli* e la cui patogenesi, ancora oggi, non è del tutto chiarita.

Altri due volatili sensibili all'infezione sono il fagiano e la faraona. In quest'ultima specie oltre a sieroconversione in seguito a infezione sperimentale (Gough *et al.*, 1988), si sono riscontrate manifestazioni cliniche simili alla sindrome della testa gonfia del pollo associate a rialzo anticorpale nei confronti di AMPV (Picault *et al.*, 1987; Kles *et al.*, 1987; Litjens *et al.*, 1989); inoltre in Sud-Africa indagini sierologiche su faraone selvatiche, campionate nei dintorni di aziende avicole, hanno rilevato una positività tale da far pensare a un ruolo di questo volatile nella trasmissione virale nella suddetta area (Horner *et al.*, 2003).

La sensibilità del fagiano è stata dimostrata già da Gough *et al.* nel 1988; successivamente a infezione sperimentale venne rilevata infatti una lieve congiuntivite e positività anticorpale. Negli allevamenti invece le prime indagini sierologiche diedero esito negativo (Gough *et al.*, 1990), ma qualche anno dopo, numerosi studi dimostrarono la presenza di AMPV in allevamenti di fagiani. Gough *et al.* nel 2001 isolarono il sottotipo A da fagiani con sintomatologia respiratoria; Catelli *et al.* (2001) invece riscontrarono positività sierologica sia in animali in allevamento che in soggetti a vita libera; Welchman *et al.* (2002) rilevarono con tecnica RT-PCR sia il sottotipo A che il B. La patogenicità di AMPV nel fagiano pare essere minima, tuttavia sembra facilitare e potenziare l'azione dei ben più pericolosi agenti batterici (Dalton e Cserep, 2004; Forrester *et al.*, 2005). Di recente è stato riportato l'isolamento del sottotipo C in fagiani in Corea (Lee *et al.*, 2007).

Il piccione, l'oca e l'anatra si sono mostrate specie refrattarie all'infezione con ceppi europei (Gough *et al.*, 1988); tuttavia è stata dimostrata una certa sensibilità degli anatidi ad AMPV sottotipo C: oltre a positività anticorpali in anatre ed oche selvatiche (Shin *et al.*, 2000a), è stata dimostrata la sensibilità di anatre pechinesi all'infezione sperimentale per vie naturali, essendo in grado non solo di evidenziare un rialzo anticorpale ma anche di reisolare il virus dopo il

challenge. Inoltre nel 1999 Toquin *et al.* hanno isolato, per la prima volta il sottotipo C in Europa, da anatre mute di 42 settimane, in Francia, con problemi respiratori e calo dell'ovodeposizione (Toquin *et al.*, 2006a). Gli stessi Autori (Toquin *et al.*, 2006b), hanno effettuato un'infezione sperimentale in anatroccoli di anatra muta di 18 giorni, valutandone la suscettibilità ai quattro sottotipi conosciuti: per quanto riguarda il sottotipo C è stato utilizzato sia un ceppo americano che il ceppo francese. I sottotipi A, B e D non hanno portato né a sintomi, né a un rialzo anticorpale, né è stato possibile reisolare il virus. Per quanto riguarda il sottotipo C invece, mentre il ceppo Colorado è stato in grado di sviluppare infezione negli animali, ma non di causare sintomatologia, l'inoculazione del sottotipo C francese ha provocato manifestazioni cliniche respiratorie. La prova è stata poi ripetuta inoculando tacchinotti di 28 giorni: in questa specie si è potuto osservare una sintomatologia clinica tipica della TRT dopo somministrazione di AMPV A, B, D e C ceppo Colorado, mentre non col ceppo C francese. Tale ceppo ha infettato i tacchinotti, ma non ha determinato alcuna manifestazione clinica. Ciò fa supporre un adattamento del nuovo ceppo all'anatra (Toquin *et al.*, 2006b).

Positività sierologiche sono state riportate nello struzzo, sia in Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994) che in Italia, in questo caso si trattava di animali importati dall'Africa (Capua *et al.*, 1998).

Infine Nagaraja *et al.* (2001) hanno inoculato il virus (sottotipo C) in topi e ratti di laboratorio, rilevando AMPV con tecnica PCR da diversi organi e riportando sierconversione.

Il *Metapneumovirus* aviare non sembra avere capacità zoonotiche. Al contrario il *Metapneumovirus* umano si è dimostrato essere in grado, almeno sperimentalmente, di infettare il tacchino e causare una lieve rinite (Velayudhan *et al.*, 2006)

2.2 RUOLO DEI SELVATICI

Sicuramente dibattuto risulta essere il ruolo degli uccelli selvatici nella diffusione e nel mantenimento dell'infezione. L'ipotesi che questi volatili possano essere coinvolti nella diffusione del virus, è sostenuta dalle numerose positività anticorpali per AMPV osservate e dall'isolamento di alcuni ceppi virali, ottenuti in alcune specie selvatiche, nonché dalla comparsa di numerosi focolai ad origine ignota, che troverebbero una valida spiegazione se questo ruolo venisse dimostrato.

In Germania, un'indagine epidemiologica svolta da Heffels-Redmann *et al.* (1998) ha permesso di evidenziare, attraverso test di sieroneutralizzazione, positività anticorpali in gabbiani della specie *Larus argentatus argentatus*. Mentre

in un'indagine svolta nel Nord Italia da Delogu *et al.* (2004), i 440 uccelli acquatici testati, tra cui la specie mediterranea *Larus cachinnans michahellis*, corrispondente biologico di quella trovata positiva da Heffels-Redmann *et al.* (1998), sono risultati negativi ai sottotipi A e B, sia sierologicamente sia alla RT-PCR. La positività riportata dal gruppo tedesco lascia supporre che la specie esaminata sia sensibile all'infezione da AMPV, ma i dati ottenuti da Delogu *et al.* (2004) indicano che tale specie possa essere considerata epifenomeno e non specie serbatoio. Nonostante ciò, la comparsa nel tempo di focolai di TRT in Europa, apparentemente senza spiegazione, lascia aperto l'interrogativo. Ad esempio non ci si spiega come il virus sia arrivato nel continente dal Sud Africa. Inoltre il primo caso in Gran Bretagna è apparso nella contea di Norfolk, la quale si trova su una delle principali rotte migratorie (Anonimo, 1985). Nella primavera del 1998 in Svezia è comparsa l'infezione (sottotipo A) in riproduttori pesanti dopo un analogo caso in Danimarca in tacchini; il focolaio è stato registrato nel sud del paese, in Scania, regione caratterizzata da un elevato passaggio di uccelli migratori (Engstrom *et al.*, 2000). Ancora più misteriosa risulta la sorprendente comparsa di un sottotipo C in Francia in anatre mute (Toquin *et al.*, 1999).

Negli Stati Uniti tale aspetto è maggiormente enigmatico. La TRT è comparsa improvvisamente in Colorado per poi scomparire nel giro di pochi mesi; Il ceppo isolato è risultato essere diverso da tutti i ceppi conosciuti fino ad allora, nasceva così il sottotipo C (Senne *et al.*, 1997). Dopo un anno la malattia è ricomparsa in Minnesota, stato con il più grande patrimonio di tacchini del Nord America. Questo paese inoltre possiede vaste aree selvagge (foreste e praterie) con più di 16.000 laghi, habitat ideale per numerosi uccelli migratori. Inoltre le epidemie nei tacchini vengono maggiormente riscontrate nei periodi primaverili e autunnali, stagioni delle grandi migrazioni (Medina e Seeley, 2003). A queste considerazioni fanno da supporto i numerosi dati raccolti in campo. È stata dimostrata la presenza di RNA virale sottotipo C e anticorpi nei confronti dello stesso in varie specie (passeri, rondini, storni e oche), oltre che in anatre usate come sentinelle nei pressi di allevamenti di tacchini, e che le sequenze del gene M dei virus evidenziati, indicavano un elevato grado di omologia con isolati di AMPV dal tacchino (Shin *et al.*, 2000a; McComb *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2002). Bennett *et al.* (2002) campionando 770 oche canadesi selvatiche (*Branta canadensis*) hanno riscontrato positività alla PCR del 66,7% ipotizzando che tale specie possa agire da serbatoio del virus e giustificare l'andamento periodico delle epidemie di AMPV in Minnesota. Tale ipotesi è supportata dai dati ottenuti da Turpin (2003) che nella stessa specie, oltre che nella fologa, hanno evidenziato, in aree dove la TRT non è endemica, AMPV-C mostranti omologie genetiche con ceppi isolati da tacchini. Tuttavia non è facile poter attribuire con certezza agli uccelli migratori un chiaro ruolo epidemiologico nel Nord America, anche perché

gli stati confinanti (Nord e Sud Dakota, Canada) non hanno ancora avuto episodi clinici o rilevamenti importanti del virus (Njenga *et al.*, 2007).

Infine in Africa, continente che ha visto apparire per la prima volta la malattia, sono state riscontrate positività anticorpali in struzzi (Cadman *et al.*, 1994) e faraone selvatiche (Horner *et al.*, 2003); si è quindi ipotizzato che il virus potesse essere presente, già prima della comparsa dell'epizoozia, nelle specie aviari selvatiche della zona.

2.3 DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA

La prima segnalazione di un'infezione da AMPV è stata fatta in Sud Africa alla fine degli anni '70 in allevamenti di tacchini (Buys e Du Preez, 1980). Successivamente il virus si è diffuso in maniera estremamente rapida in Europa a partire dagli anni '80: dapprima in Francia (Andral *et al.*, 1985) poi in Gran Bretagna (Anonimo, 1985) e in seguito in Spagna, Italia (Fabris e D'Aprile, 1990), Germania (Hafez e Woernle, 1989), Ungheria (Lantos, 1990), Austria (Polland *et al.*, 1992), Polonia (Minta *et al.*, 1995) Croazia (Bidin *et al.*, 1990), Svezia (Engstrom *et al.*, 2000), Russia (Botchkov *et al.*, 2002). Quasi contemporaneamente è stata segnalata negli allevamenti di polli la Sindrome della Testa Gonfia, prima in Sud Africa nel 1979 (Morley e Thomson, 1984) e successivamente in Europa (Picault *et al.*, 1987; Hafez e Lohren, 1990).

L'infezione da AMPV ha fatto la sua comparsa ed è presente anche in paesi extraeuropei quali Israele (Weisman *et al.*, 1988; Banet-Noach *et al.*, 2005), Yemen (Sarakbi, 1989), Marocco (Houadfi *et al.*, 1991), Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994), Taiwan (Lu *et al.*, 1994), Giappone (Uramoto *et al.*, 1990; Nunoya *et al.*, 1991), Messico (Decanini *et al.*, 1991), Caraibi (Jones, 1996), Brasile (Arns e Hafez, 1992; Chacon *et al.*, 2007), Perù, Argentina, Cile (Toro *et al.*, 1998), Giordania (Gharaibeh e Algharaibeh, 2007), Cina e Nigeria (Owoade *et al.*, 2008).

Il Nord America non è stato interessato dall'infezione fino al 1996 (Senne *et al.*, 1997), anno in cui compare in Colorado una malattia respiratoria ad alta contagiosità, da cui viene isolato AMPV. Tale focolaio si estinse dopo un anno e la malattia ricomparve in Minnesota, area in cui oggi l'infezione è endemica. Il continente che ancora non sembra essere interessato dall'infezione da AMPV è l'Oceania (Bell e Alexander, 1990).

Risulta interessante la diffusione geografica dei sottotipi; infatti mentre AMPV A e B hanno una diffusione mondiale, ad eccezione del Nord America e dell'Australia, AMPV C si trova solo in Nord America; recentemente però sono stati isolati AMPV sottotipi C in Francia (Toquin *et al.*, 2006a) e in Corea (Lee *et al.*, 2007). Il sottotipo D è stato rilevato solo in Francia in un caso di TRT nel 1985

(Bayon Auboyer *et al.*, 2000) e ad oggi non si conoscono infezioni di campo date da questo ceppo, che resta un rilevamento episodico.

2.4 METAPNEUMOVIRUS AVIARE IN ITALIA

La Rinotracheite del Tacchino fa la sua comparsa in Italia nel 1987, poco dopo la sua diffusione in Europa, e l'agente eziologico è isolato da due gruppi di ricercatori nello stesso periodo (Franciosi, comunicazione personale; Fabris e D'aprile, 1990). Da allora la malattia ha continuato ad essere osservata ed è comparsa anche nel pollo, nel fagiano e nella faraona (Cordioli *et al.*, 1990; Capua *et al.*, 1995; Anonimo, 1996; Massi, 1997; Fabris *et al.*, 1998a; Fabris *et al.*, 1998b; Capua, 1998; Capua e Lavazza, 1999; Catelli e Lavazza, 2000; Catelli *et al.*, 2001).

Tuttavia fino agli anni 2000 i dati sui sottotipi di AMPV circolanti erano scarsi, se si esclude la tipizzazione molecolare dei primi isolati, risultati appartenere al sottotipo B (Juhász e Easton, 1994). Indagini più recenti, svolte abbinando tecniche di isolamento virale, sierologia e biologia molecolare, hanno permesso di confermare una ampia diffusione della infezione sia nel pollo che nel tacchino. Il sottotipo prevalente in nord Italia è risultato essere il B, anche se nel 2003, in un allevamento di tacchini del centro Italia, è stato evidenziato il sottotipo A, mai prima segnalato nel nostro Paese (Cecchinato *et al.*, 2003; Catelli *et al.*, 2004).

L'introduzione della vaccinazione sembra avere avuto un impatto sulla dinamica dell'infezione da AMPV nel tacchino in Italia: negli anni 2001-2002, infatti, è stata introdotta la vaccinazione di massa a seguito della quale le evidenze di AMPV tendono ad essere complessivamente a diminuire, ma è aumentata la frequenza di focolai tardivi (Catelli, 2006) (figura 4). E' stata evidenziata anche la presenza di focolai precoci e non, causati dagli stessi ceppi vaccinali che si sono dimostrati capaci di tornare a virulenza (Catelli *et al.*, 2006; Ricchizzi *et al.*, 2008). Nel pollo è stata evidenziata, in minore misura rispetto al tacchino, la presenza di AMPV, sia sottotipo A che B sia nei gruppi da carne sia in quelli in deposizione, siano essi riproduttori o ovaiole leggere (Catelli, 2006).

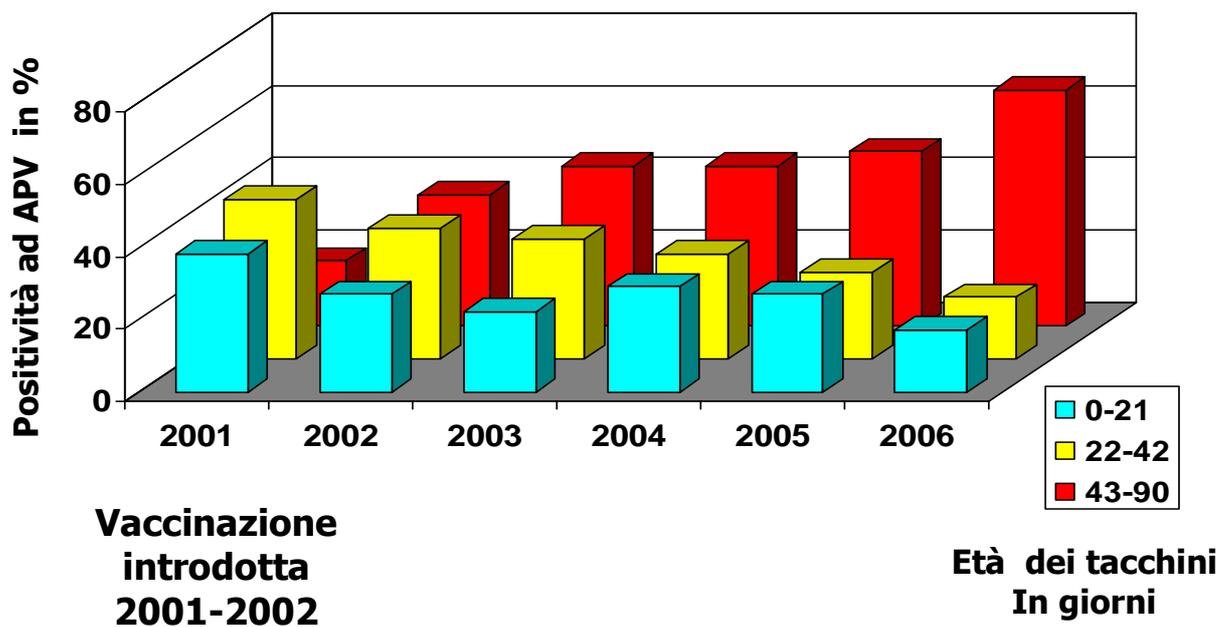


Figura 4. Distribuzione percentuale, per età, dei tacchini positivi ad AMPV (Catelli, 2006)

2.5. MODALITÀ DI TRASMISSIONE

Il *Metapneumovirus* aviare è un virus scarsamente resistente al di fuori dell'ospite. Inoltre la sua replicazione è limitata all'apparato respiratorio e ciò suggerisce che, molto probabilmente, la via aerea sia la principale via di trasmissione. La breve persistenza del virus negli ospiti fa supporre poi che il contagio possa verificarsi per un tempo breve dopo l'infezione. Molto probabilmente non esistono vettori e il virus non è in grado di dare latenza negli animali. Benché il virus sia stato evidenziato nell'ovidutto di riproduttori, questo è stato riportato in una sola occasione e le condizioni di campo suggeriscono che la trasmissione mediante le uova sia improbabile (Cook, 2000b). Tutto ciò rende difficile spiegare come mai il pneumovirus aviare, quando ha fatto la sua comparsa in Europa, si sia propagato così rapidamente come si è verificato nel Regno Unito. Risulta sicuramente evidente che il virus sia dotato di un'alta infettività. Si ritiene comunque che l'acqua infetta, lo spostamento di soggetti malati, il personale e le attrezzature contribuiscano in qualche modo alla trasmissione del virus. Secondo Stuart (1989), autocarri che trasportano mangime e gli altri mezzi che si spostano continuamente da azienda ad azienda, sono probabilmente stati un veicolo importante nello scenario inglese. Come detto prima, anche gli uccelli selvatici potrebbero avere una grossa importanza per l'epidemiologia della malattia ma il loro ruolo deve ancora essere stabilito.

È da sottolineare che in Scozia, dove la densità dei tacchini è molto più bassa, l'infezione non è comparsa che dopo diversi anni. Inoltre, i dati sulla capacità di trasmissione dell'AMPV da soggetti malati a soggetti sani in condizioni sperimentali sono discordanti. Infatti, secondo Giraud *et al.*, (1986, 1988) il virus può essere trasmesso per via aerea da soggetti infetti ad animali non infetti tenuti in gabbie separate. Al contrario Cook *et al.* (1991) riferiscono che il tentativo di verificare questa possibilità è fallito benché il flusso dell'aria fosse favorevole. La probabile difficoltà di trasmissione tra animali tenuti separati, insieme ad una possibile scarsa o lenta trasmissione sulle lunghe distanze, è confermata dall'attuale situazione degli Stati Uniti. Infatti è stata evidenziata un'alta incidenza di infezione nella popolazione di tacchini in Minnesota, che però non si è diffusa a macchia d'olio negli altri stati degli USA. Si può quindi concludere che, in analogia con i pneumovirus dei mammiferi, il contatto diretto rappresenta la più importante modalità di trasmissione (Cook, 2000b).

3. PATOGENESI

Il *Metapneumovirus* aviare infetta generalmente il primo tratto dell'apparato respiratorio e solo occasionalmente lo si può riscontrare nei polmoni. Il virus penetra nell'ospite principalmente per via aerogena (gocce di saliva e muco di animali infetti, polvere), venendo a contatto con l'epitelio cigliato delle cavità nasali, dei turbinati e della trachea, nei confronti del quale mostra uno spiccato tropismo. Vie secondarie d'ingresso sono la via oculare, usata anche in corso di infezioni sperimentali, e quella orale attraverso la fessura palatina. Dopo penetrazione l'agente infettante replica attivamente nelle cellule cigliate delle prime vie respiratorie scatenando una risposta infiammatoria da parte dell'ospite.

3.1 REPLICAZIONE E PERSISTENZA DEL VIRUS NEI TESSUTI

I principali siti di replicazione di AMPV (siti primari di replicazione) sono rappresentati dalle cavità nasali, dai seni infraorbitali, dalla trachea e, con minor frequenza, dai polmoni. Il virus, però, può raggiungere anche l'apparato riproduttore, o per contiguità dai sacchi aerei o a seguito di viremia (Jones *et al.*, 1988), e replicare nell'epitelio dell'ovidutto maturo (Jones *et al.*, 1988) determinando una riduzione della funzionalità dell'ovaio.

Nel tacchino, AMPV è stato reisolato su organocolture di anelli tracheali di embrione di pollo dalla trachea di tacchini infettati per via oculare dal secondo fino al quinto giorno dopo l'infezione (McDougall e Cook, 1986; Jones *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 1991). Attraverso tecniche di immunofluorescenza, è stato evidenziato l'antigene virale nell'epitelio della trachea e dei turbinati nasali fino a 7 giorni post-inoculazione, con il numero massimo di cellule fluorescenti tra la terza e la quinta giornata. Al contrario i sacchi aerei e i polmoni hanno dato risultati negativi (Jones *et al.*, 1988). Mediante tecniche immunoistochimiche, Majò *et al.* (1995) hanno altresì dimostrato che l'antigene di AMPV si ritrova principalmente associato alle ciglia e, occasionalmente, nel citoplasma delle cellule epiteliali. Piccole quantità di virus possono essere presenti fino al quattordicesimo giorno dall'inoculazione (Cook *et al.*, 1991). Mediante l'uso della Polymerase Chain Reaction (PCR) si è potuto evidenziare l'RNA virale da tamponi tracheali ed esofagei fino a 17-19 giorni dopo l'infezione (Li *et al.*, 1993).

Nel pollo i risultati di infezioni sperimentali hanno fatto ipotizzare una minore sensibilità di questa specie all'infezione rispetto ai tacchini (Gough. *et al.*, 1988). In realtà, Jones *et al.* (1987; 1988), Buys *et al.* (1989a) e Cook *et al.* (1993b) hanno evidenziato una maggior sensibilità del pollo nei confronti di ceppi omologhi. Le ricerche hanno comunque dimostrato che la distribuzione nei tessuti

e la replicazione di AMPV nel pollo è simile a quanto si verifica nel tacchino. Per mezzo dell'isolamento virale e di tecniche immunoistochimiche, il virus è stato evidenziato solo nei tessuti dell'apparato respiratorio, in particolare nei turbinati e per un periodo dopo l'infezione sovrapponibile a quello riscontrato nei tacchini (Catelli *et al.*, 1998).

Recentemente Aung *et al.*, 2008 hanno mostrato che isolati di AMPV da tacchino inducono lesioni rappresentative nel broiler, come il rigonfiamento dei seni infraorbitali, indicando il ruolo di AMPV come patogeno primario anche nel pollo.

Per quel che riguarda i tratti più profondi dell'apparato respiratorio, infezioni sperimentali sia nei polli che nei tacchini hanno dimostrato che il virus può, talvolta, raggiungere anche i polmoni (Cook *et al.*, 1993b; Majò *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998; Alkhalaf *et al.*, 2002) e, nei polli, i sacchi aerei (Cook *et al.*, 1993b).

E' emerso inoltre che i due sottotipi A e B possano essere dotati di una diversa patogenicità nei confronti dell'apparato respiratorio dei tacchini (Van de Zande *et al.*, 1999): si è osservato che solo il tipo A è in grado di infettare le parti più profonde dell'apparato respiratorio ed infetta un numero di cellule epiteliali doppio rispetto al sottotipo B, in ogni tratto delle prime vie respiratorie raggiungendo titoli virali più alti.

Jones *et al.*, (1988), in seguito ad un' infezione sperimentale nel tacchino, sono riusciti a dimostrare che, in questa specie, l'apparato riproduttore è sede di replicazione virale. Infatti, 9 giorni dopo l'inoculazione, il virus è stato isolato dal magnum medio e dalla vagina e, mediante tecniche di immunofluorescenza (IF), l'antigene virale è stato evidenziato nelle cellule epiteliali dell'utero fino al settimo giorno e in tutte le porzioni dell'ovidutto fino al nono giorno dall'infezione.

Nel pollo, a differenza del tacchino, i tentativi di isolare il virus o di evidenziare l'antigene virale nell'apparato riproduttore, dopo infezione sperimentale per vie naturali, hanno dato esito negativo. Majò *et al.* (1995), infettando sperimentalmente per via oculonasale riproduttori di 27 settimane, hanno dimostrato la presenza dell'antigene virale nell'apparato respiratorio mediante IF e immunoperossidasi (IP), ma non nell'ovidutto. Anche Catelli *et al.*, (1998) che hanno usato per la sperimentazione polli SPF di due settimane, sono giunti ad un analogo risultato.

Malgrado la mancanza di dati sperimentali che giustifichino il ruolo di AMPV come patogeno nelle galline ovaiole, sono in aumento i riscontri in campo riguardo la capacità del virus di indurre alterazioni nella produzione di uova nei polli.

Due distinti gruppi di ricerca (Khera e Jones, 1999; Cook *et al.*, 2000) hanno effettuato studi di patogenicità del virus per l'apparato riproduttivo dei polli usando vari modelli sperimentali. Khera e Jones (1999) hanno messo a punto un

protocollo sperimentale che prevedeva studi *in vitro*, usando colture di ovidutto (OOC), ed *in vivo*, sia in pulcini trattati con estrogeni per ottenere una maturazione precoce dell'ovidutto che in femmine adulte. Mediante la tecnica di immunofluorescenza è stato evidenziato l'antigene virale su OOC, al contrario, nelle femmine adulte infettate per via oculonasale (mimando un'infezione naturale) o per via venosa, non è stata dimostrata la presenza del virus nell'ovaio o nell'ovidutto. Cook *et al.* (2000), eseguendo uno studio assimilabile a quest'ultimo, hanno osservato la replicazione del virus nell'epitelio dell'ovidutto di galline infettate per via endovenosa, ma, anche in questo caso, l'inoculazione per via oculonasale ha dato esito negativo. Una giustificazione delle divergenze dei risultati ottenuti potrebbe essere attribuita alle differenze esistenti tra i ceppi usati: nella sperimentazione *in vivo* Khehra e Jones (1999) hanno utilizzato per l'inoculazione un ceppo isolato dal tacchino (perché del ceppo tacchino già si conosceva la capacità replicativa nell'apparato riproduttivo del tacchino), mentre Cook *et al.* (2000) hanno usato un ceppo isolato dal pollo. Poiché, come detto precedentemente, i diversi ceppi sembrano in grado di dare infezioni più gravi nelle specie omologhe, l'utilizzo di un ceppo di pollo potrebbe aver dato come risultato la replicazione del virus nell'ovidutto di femmine adulte. I risultati di entrambi gli studi portano alla comune conclusione che l'epitelio duttale del pollo sia in sé sensibile all'infezione da AMPV con ceppi isolati sia dal pollo che dal tacchino ma resistente ad un'infezione per via naturale.

Nella maggior parte delle prove sperimentali di patogenesi effettuate non è stata riscontrata nessuna traccia del virus in altri tessuti od organi (Cook, 2000b), eccezion fatta per il sottotipo C che è stato isolato dall'intestino (Shin *et al.*, 2000b) ed evidenziato mediante PCR e tecniche di ibridazione *in situ* nella milza (Sharma *et al.*, 2002). Non si conoscono le cellule target in questo organo, ma, da studi condotti *in vitro*, si è ipotizzato che siano i macrofagi, data la loro sensibilità alla infezione e replicazione di AMPV. E' possibile che i macrofagi acquisiscano il virus a livello dell'epitelio delle prime vie respiratorie e lo veicolino in altri organi quali la milza (Sharma *et al.*, 2002).

Sono state altresì effettuate ricerche sperimentali allo scopo di valutare quale sia l'influenza di altri patogeni respiratori sulla replicazione del pneumovirus.

Nel tacchino, la duplice infezione con il virus in associazione a batteri comunemente presenti in campo, quali *Bordetella avium* e organismi *Pasteurella-like*, induce un aggravamento della sintomatologia clinica (Cook *et al.*, 1991; Alkhalaf *et al.*, 2002; Jirjis *et al.*, 2004), ma potrebbe non influenzare la durata della replicazione virale (Cook *et al.*, 1991). Jirjis *et al.* (2004) hanno evidenziato inoltre come nelle infezioni da AMPV in associazione a *Bordetella avium* si possano avere lesioni a livello polmonare, normalmente non presenti con il solo pneumovirus, e si possa avere replicazione virale in questo organo.

Naylor *et al.* (1992) e Ganapathy *et al.* (1998) hanno dimostrato che un'infezione con AMPV accelera la colonizzazione delle porzioni più profonde delle prime vie respiratorie da parte di *Mycoplasma gallisepticum* o *Mycoplasma imitans*. Inoltre osservazioni di campo, hanno suggerito che AMPV possa aggravare l'infezione da *Ornithobacterium rhinotracheale* (Cook, 2000b; Jirjis *et al.*, 2004). Al contrario Khehra *et al.* (1999) eseguendo infezioni intercorrenti con pneumovirus e *Mycoplasma synoviae* non hanno evidenziato nessuna sinergia. Van de Zande *et al.* (2001) hanno effettuato uno studio allo scopo di valutare gli effetti di una duplice infezione con AMPV ed *Escherichia coli*. I risultati hanno dimostrato che il Pneumovirus aviare è in grado di predisporre l'apparato respiratorio alla colonizzazione ed invasione da parte di *E.coli*. Infatti, le modificazioni che subisce l'epitelio respiratorio durante la replicazione del virus insieme alla risposta immunitaria potrebbero indurre l'espressione, sulla superficie cellulare, di recettori per *E. coli*, permettendo la colonizzazione da parte del batterio. La fase di invasione delle parti più profonde dell'apparato respiratorio sarebbe invece favorita dal virus attraverso un'alterazione del sistema mucociliare. Tali dati però discordano rispetto a quanto riportato da Jirjis *et al.* (2004) che non hanno osservato nessuna differenza sia sintomatologica che anatomopatologica tra un gruppo inoculato con AMPV-C e un altro con AMPV-C e *E.coli* assieme. Tali discordanze potrebbero essere dovute al ceppo di *E.coli* o di AMPV utilizzati nella prova.

Turpin *et al.* (2002) hanno inoltre evidenziato che la duplice infezione di tacchini con AMPV-C e virus della malattia di Newcastle lentogeni esita in una sinergia in grado di riprodurre forme cliniche di gravità simile a quelle osservate in campo.

Nel pollo sono state effettuate simili ricerche poiché studi microbiologici su casi clinici di SHS hanno dimostrato la presenza di vari batteri in associazione con il virus (Pattison *et al.*, 1989; Nunoya *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1994). In particolar modo *E.coli* svolge un ruolo importante nella sindrome della testa gonfia, ed è stato isolato da organi interni, orecchio medio, meningi e cervello in casi di SHS in broiler e riproduttori che presentavano anticorpi per il pneumovirus (Al-Ankari *et al.*, 2001). Infezioni miste con AMPV ed *E. coli* sono state effettuate allo scopo di valutare il comportamento dei due agenti (Majò *et al.*, 1997; Al-Ankari *et al.*, 2001). Majò *et al.* (1997) hanno dimostrato un effetto sinergico tra i due agenti che si esplica in una maggiore diffusione del virus lungo l'albero respiratorio e in una più intensa replicazione del batterio. Al-Ankari *et al.* (2001) sono giunti a risultati che ribadiscono il concetto di sinergismo tra i due agenti; infatti nelle infezioni miste *E.coli* è stato isolato nel 100% degli animali, mentre nei polli inoculati solo col batterio il numero di positivi varia tra il 55 e il 67%; il numero di batteri ritrovato nei soggetti che hanno subito la doppia infezione è molto più alto; in

corso di infezioni miste, il virus persiste nelle coane per un periodo di tempo più lungo. I risultati ottenuti da entrambe le ricerche fanno supporre che AMPV, riducendo le difese dell'ospite, favorisca l'invasione da parte del batterio.

Sono stati inoltre effettuati studi *in vitro* e *in vivo* per valutare l'eventuale interferenza tra AMPV ed il Coronavirus della Bronchite Infettiva (IBV) (Jones *et al.*, 1998). I risultati hanno evidenziato una netta predominanza di IBV sulla replicazione di AMPV: infatti infettando organocolture tracheali (TOC) con entrambi i virus simultaneamente, il tempo per ottenere la cigliostasi è risultato simile al controllo inoculato solo con IBV e, all'immunofluorescenza su TOC, l'antigene AMPV è risultato evidenziabile per un solo giorno post inoculazione.

4. SINTOMATOLOGIA

Nel tacchino la patologia prende il nome di Rinotracheite del Tacchino (Turkey Rhinotracheitis o TRT) e può colpire soggetti di tutte le età. Il periodo di incubazione dura circa 2 giorni (Jirjis *et al.*, 2002), e la malattia in 12-24 ore si propaga all'interno dell'intero capannone, dando una morbilità che si avvicina al 100%; in pochi giorni vengono interessati anche i capannoni vicini (Stuart, 1989). I sintomi (figura 5) sono rappresentati da scolo nasale dapprima sieroso e poi mucopurulento, scolo oculare spesso schiumoso, tosse, starnuti, scuotimento del capo, rantoli, rigonfiamento dei seni infraorbitali, dispnea, depressione e diminuzione dell'assunzione del mangime con conseguente calo dell'incremento ponderale (Jones *et al.*, 1986; McDougall e Cook, 1986; Wyeth *et al.*, 1986; Buys *et al.*, 1989a; Turpin *et al.*, 2002).



Figura 5. Sintomatologia da AMPV in tacchini infettati sperimentalmente: evidente rigonfiamento del seno infraorbitale destro (foto a sinistra) ed essudato schiumoso oculare (Archivio di Patologia Aviaria, Università di Bologna)

Generalmente, in assenza di complicazioni, il recupero è rapido e la sintomatologia scompare nel giro di 10-14 giorni (Cook, 2000b). La mortalità è estremamente variabile, da quasi nulla può arrivare al 50% (Wyeth, 1990). I principali fattori che influenzano la mortalità sono: l'età dei soggetti, la gestione dell'allevamento e le eventuali infezioni intercorrenti. Per quel che riguarda l'età, la mortalità è più alta nei giovani, nei quali l'eccesso di muco o tappi di materiale caseoso possono ostruire la trachea causando edema polmonare e asfissia. Al contrario, negli animali che hanno superato la tredicesima settimana, la morte si verifica più raramente (Stuart, 1989).

I batteri più frequentemente responsabili di sovrainfezioni sono *E.Coli* e *Bordetella avium* (Cook *et al.*, 1991), ma possono essere coinvolti anche *Ornithobacterium rhinotracheale* (Marien *et al.*, 2005), *Chlamydophila psittaci* (Van Looock *et al.*, 2006) e *Riemerella anatipestifer* (Rubbenstroth *et al.*, 2007).

La gravità della sintomatologia è fortemente condizionata dalle pratiche di allevamento; in particolare la ventilazione, l'igiene e la densità sono fattori aggravanti la malattia. Anche le sovrainfezioni batteriche sono un aspetto da tenere in forte considerazione (Stuart, 1989; Hafez, 1993). Non sembrano esserci invece differenze legate al sottotipo o alla specie di provenienza (tacchino o pollo) del ceppo virale responsabile della malattia: ceppi tacchino infatti si sono dimostrati capaci di causare una sintomatologia evidente in infezioni sperimentali con polli (Aung *et al.*, 2008). Inoltre, negli USA, la malattia è stata osservata solamente negli allevamenti di tacchini (Cook, 2000a), tuttavia Shin *et al.* nel 2000 (b) hanno dimostrato sperimentalmente la suscettibilità del pollo al sottotipo C.

Metapneumovirus aviare nel pollo causa forme respiratorie più lievi rispetto al tacchino, che a volte decorrono in forma inapparente. All'infezione con AMPV può però seguire, con l'intervento di *E.coli*, la Sindrome della testa gonfia



Figura 7. Pollo affetto da Sindrome della Testa Gonfia (Archivio Fot. Patologia Aviare, Università di Bologna).

(figura 7) che è una patologia a eziologia complessa, caratterizzata da sintomatologia respiratoria ed ingrossamento del capo dovuto ad edema e infiltrazione infiammatoria del sottocute di natura fibrino-granulomatosa. Sono interessate le regioni perioculari, intermandibolare, nuca, collo e bargigli. Gli animali colpiti mostrano grave depressione e sonnolenza. In alcuni casi si può assistere all'insorgenza di otite media e osteite a carico delle ossa craniche, con possibile interessamento di meningi ed

encefalo e conseguente sintomatologia nervosa quale opistotono, disorientamento ed atassia. Generalmente sia morbilità sia mortalità sono basse, attorno al 3-4% (Morley e Thomson, 1984; O'Brien *et al.*, 1985). Sembrano essere coinvolte nell'eziologia sia componenti virali che batteriche; la prima è data da AMPV, o anche dal *Coronavirus* della Bronchite Infettiva aviare o dal *Paramyxovirus* tipo-1 (Morley e Thomson, 1984), mentre la seconda è rappresentata nella maggior parte dei casi da *E.Coli*. Nonostante siano stati fatti numerosi tentativi, non è ancora stato possibile riprodurre la SHS in condizioni sperimentali: infezioni miste con AMPV ed *E.Coli* hanno infatti causato una sintomatologia più grave rispetto alla

sola infezione virale, senza però ricreare la sindrome (Majò *et al.*, 1997; Nakamura, 1998; Al-Ankary *et al.*, 2001); i quadri sintomatologici ottenuti sperimentalmente sono tuttavia ascrivibili alle fasi precoci della SHS.

Lo stesso virus che causa malattia nel tacchino è in grado di infettare il pollo e di indurre sintomatologia (Jones *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1993b; Majò *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998). Il virus è stato comunque isolato dal campo da soggetti di ogni età (Picault *et al.*, 1987; Buys *et al.*, 1989b; Jones *et al.*, 1991; Gough *et al.*, 1994; Maharaj *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1995) anche se non sempre associato a malattia clinica (Cook *et al.*, 1988). Attraverso infezioni sperimentali con il *Metapneumovirus* si sviluppa una sintomatologia clinica, simile a quella del tacchino (Figura 6), ma solitamente più lieve, che scompare nel giro di dieci giorni (Majò *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998; Aung *et al.*, 2008). Ad esempio Catelli *et al.* (1998) hanno riscontrato solo una lieve rinite, mentre studi più recenti hanno riportato rigonfiamento dei seni infraorbitali per la prima volta in questa specie in condizioni sperimentali (Shin *et al.*, 2000b; Aung *et al.*, 2008).

Negli animali in deposizione si osservano sintomi respiratori più lievi che negli animali giovani, o addirittura assenti (Stuart, 1989), a cui si associano importanti alterazioni della funzione riproduttiva. Nella tacchina riproduttrice è stato riportato un calo dell'ovodeposizione del 10-20% (Schricke, 1984), fino ad un massimo del 70% (Wyeth, 1990; Meini, 1996); tali manifestazioni compaiono, generalmente, alcuni giorni dopo la sintomatologia respiratoria (Picault, 1988) e durano circa tre settimane (Anonimo, 1985), dopodiché la deposizione torna a livelli normali (Stuart, 1989). Le uova, inoltre, si presentano malformate, rotte, piccole, decolorate, con guscio sottile ed evidenti concrezioni; mentre non sembrano essere inficcate la fertilità e schiudibilità delle restanti uova. I peggiori danni si hanno quando la TRT infetta gli animali all'inizio del ciclo produttivo (Stuart, 1989). In alcuni animali è stato anche osservato il prolasso dell'ovidutto (Jones, 2002).

Nella gallina, sia essa riproduttrice oppure ovaiole, in seguito a segnalazioni di SHS è stato rilevato un calo della deposizione del 2-3%, ma anche del 10%, fino al 40% (O'Brien, 1985; Picault, 1988), oltre a malformazione a carico delle uova (Drouin *et al.*, 1985). Durante infezioni sperimentali con AMPV nel pollo, le alterazioni della funzione riproduttiva si sono manifestate solo in seguito a somministrazione del virus per via endovenosa (Cook *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 2004). In particolare Cook *et al.* (2000) rilevarono un calo della deposizione del 26.7 % della durata di tre settimane; con successivo ritorno della produzione ai livelli preinfezione. Hess *et al.* (2004) riferiscono in galline White Leghorn, un'ovodeposizione che passa dall'85.7% al 56.2% in seguito al challenge. E' stato ipotizzato inoltre che AMPV giochi un ruolo, insieme a IBV, in cali della fertilità nel gallo (Villareal *et al.*, 2007)

5. LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

Tale aspetto non rappresenta un rilievo discriminante ai fini diagnostici, essendo un quadro compatibile con numerose patologie aviari, sia virali che batteriche, causanti problemi respiratori.

5.1 LESIONI MACROSCOPICHE

Nel tacchino osserviamo un quadro infiammatorio a carico delle prime vie respiratorie (rinite, sinusite, tracheite), con essudato inizialmente sieroso, poi mucoso e, in caso di sovrainfezione batterica, mucopurulento (Stuart, 1989). Le narici mostrano spesso delle croste occludenti l'orifizio e i seni infraorbitali risultano aumentati di volume, tanto da alterare la simmetria della testa, poiché stipati di muco, o materiale caseoso; a volte però risultano semplicemente timpanici (Stuart, 1989). Vengono anche riportati una lieve congiuntivite, caratterizzata da scolo schiumoso, ed edema sottomandibolare (Stuart, 1989). Nelle femmine in deposizione, oltre alle lesioni all'apparato respiratorio sopra descritte, sono state evidenziate anche diverse lesioni anatomo-patologiche dell'apparato riproduttore, quali, regressione dell'ovaio con diminuzione del numero dei follicoli ovarici, degenerazione a carico dell'ovidutto, dispersione di materiale vitellino in addome, peritonite ovarica nonché ritenzione di uova malformate (Jones *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1991).

Nelle infezioni complicate da agenti batterici si nota un aggravamento del quadro necroscopico per la presenza di aerosacculite, pericardite, polmonite, periepatite e splenomegalia (Stuart, 1989). In particolare un quadro così generalizzato è caratteristico delle sovrainfezioni da *E.Coli* (Van de Zande *et al.*, 2001), mentre altri batteri, come ad esempio i *Mycoplasmi*, tendono ad aggravare semplicemente le lesioni a livello respiratorio (Naylor *et al.*, 1992)

Nel pollo le lesioni tendono a essere simili, ma più modeste: spesso l'unico reperto, in seguito a infezione sperimentale, è una lieve rinite a decorso rapido (Catelli *et al.*, 1998). Quadri più gravi sono stati evidenziati in seguito a infezioni sperimentali duplici con *E.Coli* e *Metapneumovirus* aviare (Majò *et al.*, 1997; Al-Ankari *et al.*, 2001); in particolare Majò *et al.* (1997) hanno osservato, oltre a una imponente rinite e sinusite con essudato purulento, anche edema periorbitale, aerosacculite fibrinosa, pericardite fibrinosa e infiltrazione purulenta negli spazi aerei delle ossa del cranio. Al-Ankari *et al.* (2001) riportano inoltre in alcuni animali edema sottocutaneo alla base della testa e congestione encefalica.

Durante episodi di SHS vengono comunemente riportati: edema sottocutaneo, che decorre in una infiltrazione sottocutanea fibrino-caseosa, blefarite, artrite mascellare, osteite delle ossa del cranio (Picault, 1988),

aereosacculite, pericardite, otite media purulenta, ovarite, oviduttite, peritonite (Hafez et al., 1993), accumulo di essudato caseoso negli spazi aerei del cranio (Pattison et al., 1989), nonché congestione e petecchie delle alte vie respiratorie (Morley e Thomson, 1984).

5.2 LESIONI MICROSCOPICHE

Le principali lesioni istopatologiche osservate in corso d'infezione da AMPV riguardano l'epitelio respiratorio ciliato, soprattutto dei turbinati, ma anche dei seni, della trachea e dei bronchi ed hanno la medesima localizzazione sia nel pollo che nel tacchino. Nei turbinati osserviamo dapprima una infiammazione sierosa con esfoliazione epiteliale, perdite focali di ciglia, iperemia e infiltrazione sottomucosa di mononucleati. Successivamente l'infiammazione diventa mucocattarrale, con essudato costituito da eterofili, epitelioцитi, eritrociti e naturalmente muco; inoltre si manifesta una iperplasia epiteliale e ghiandolare. Queste alterazioni si riscontrano anche a livello della mucosa dei seni infraorbitali della trachea e talvolta dei bronchi, seppur in modo lieve (Majò *et al.*, 1995). Il processo di riparazione e rigenerazione tissutale inizia 14 giorni PI (Aung *et al.*, 2008), mentre la completa riparazione dei tessuti si ha fra i 18 (Catelli *et al.*, 1998) e i 21 giorni dall'infezione (Aung *et al.*, 2008). Aung et al. (2008) oltre alle lesioni già descritte, riportano un quadro infiammatorio caratterizzato da massiva infiltrazione linfocitaria anche nella ghiandola di Harder e nella ghiandola lacrimale; nessuna alterazione invece a carico della milza e della borsa di Fabrizio. Cook et al. (2000), dopo infezione sperimentale per via endovenosa in galline, rilevano nell'ovidutto alterazioni che esitano in foci con perdita dell'epitelio duttale. La complicazione batterica, come già detto, determina l'insorgere dell'essudato purulento come elemento caratterizzante (Majò *et al.*, 1997).

Nella Sindrome della testa gonfia, oltre alle lesioni respiratorie e alle alterazioni setticemiche classiche (pericardite, peritonite, aerosacculite, etc), notiamo a carico della testa una cellulite caratterizzata dalla presenza di eterofili e linfociti (Morley e Thomson, 1984), periostite, infiammazione purulenta degli spazi aerei del cranio che spesso si estende anche ai muscoli, otite sia esterna che medio-interna e meningite; a livello encefalico sono inoltre riportate: gliosi, iperemia, emorragie, manicotti perivascolari e lesioni degenerative a carico delle cellule del Purkinje del cervelletto (Pattison *et al.*, 1989; Hafez, 1993).

6. RISPOSTA IMMUNITARIA

Come in molte patologie a tropismo respiratorio, l'immunità locale gioca un ruolo fondamentale nel prevenire l'infezione da parte di AMPV. In seguito a infezione è stata riscontrata infatti una forte infiltrazione e proliferazione linfocitaria nelle prime vie respiratorie (Cha *et al.*, 2006) e nella ghiandola di Harder (Sharma *et al.*, 2002; Liman e Rautenschlein, 2007) con una elevata prevalenza delle cellule produttrici di immunoglobuline di tipo A (Cha *et al.*, 2006), nonché, come logico, un aumento dei livelli di IgA ed IgG nelle lacrime (Cha *et al.*, 2006) e nella trachea (Liman e Rautenschlein, 2007). Tali anticorpi si sono rivelati essere virus-neutralizzanti (Kheara e Jones, 1999). L'importanza dell'immunità locale supporta lo sviluppo di vaccini termosensibili, che in condizioni sperimentali si sono dimostrati un'ottima difesa contro l'infezione (Patnayak *et al.*, 2003). Per quanto riguarda l'immunità sistemica, l'immunità umorale sembra non essere proteggente mentre l'immunità cellulo-mediata si è dimostrata molto importante per la prevenzione dell'infezione. Infatti pulcini bursectomizzati, quindi incapaci di produrre anticorpi, e successivamente vaccinati, si sono mostrati resistenti all'infezione con un ceppo virulento (Jones *et al.*, 1992). Si è spiegata invece, l'inefficacia proteggente degli anticorpi circolanti supponendo che non riescano ad arrivare nei siti primari di replicazione (turbinati e trachea) (Naylor *et al.*, 1997b).

Alcuni autori (Chary *et al.*, 2002) attribuiscono al *Metapneumovirus* aviare un'azione immunodepressiva ed in particolare hanno notato una diminuzione dell'attività mitogenica a carico delle cellule T durante la prima settimana post infezione, mentre l'immunità umorale non sembra subire alcuna menomazione. Comunque ulteriori studi dovranno essere effettuati, anche se tale dato risulta interessante, poiché l'immunità cellulo-mediata è proteggente nei confronti del virus e quindi un suo deficit faciliterebbe la moltiplicazione virale nell'organismo.

L'immunità passiva non è in grado di prevenire le infezioni da AMPV. Naylor *et al.* (1997b) hanno infatti inoculato il virus in tacchinotti di un giorno di vita con un alto livello di anticorpi materni, osservando successivamente sintomatologia, che tuttavia si è dimostrata inferiore a quella riscontrata a seguito di infezione sperimentale di animali privi di tale immunità. Il titolo anticorpale nei soggetti neonati, comunque, risulta direttamente dipendente dal livello degli anticorpi circolanti della madre, ed ha una durata di 15-20 giorni (Hafez, 1993).

E' stato inoltre dimostrato che esiste interferenza nella stimolazione della risposta immunitaria fra AMPV ed altri virus, con conseguente riduzione della risposta anticorpale nei confronti di AMPV stesso. Fra questi in primo luogo il virus della bronchite infettiva (IBV), che oltre ad inibire la replicazione del *Metapneumovirus* aviare provoca un significativo abbassamento del titolo

anticorpale, in particolar modo se somministrato contemporaneamente o 48 ore prima rispetto ad AMPV (Jones *et al.*, 1998).

Anche il virus della Malattia di Newcastle (NDV) sembra avere un'azione analoga all'IBV. Ganapathy *et al.* (2005) studiando gli effetti della somministrazione contemporanea di un vaccino nei riguardi di AMPV ed uno nei riguardi NDV hanno osservato, in paragone con un gruppo vaccinato solamente con vaccino per il *Metapneumovirus* aviare, un mancato incremento dell'immunità umorale ma nessuna differenza nel livello delle Ig-A presenti nel fluido lacrimale. Tuttavia recenti studi di duplice somministrazione di vaccini vivi attenuati per AMPV ed NDV non hanno confermato tali dati, non avendo mostrato alcuna interferenza nella risposta immunitaria (Ganaphaty *et al.*, 2007).

7. DIAGNOSI

7.1. DIAGNOSI CLINICA

Né la sintomatologia clinica né la necropsopia sono sufficienti ad emettere una diagnosi eziologica di AMPV, e ciò vale sia per la TRT che per la SHS. Numerosi virus e batteri, infatti, sono in grado di causare sintomi e lesioni simili, se non uguali, a quelli causati dal *Metapneumovirus* aviare sia nel tacchino che nel pollo.

7.2. ISOLAMENTO VIRALE

Per l'isolamento di AMPV da campioni prelevati in campo possono essere usate le uova embrionate SPF di pollo (Buys *et al.*, 1989a; Cook *et al.*, 1999), le organocolture di anelli tracheali (TOC) di embrioni di pollo o di tacchino (McDougall e Cook, 1986; Wyeth *et al.*, 1986) e alcune linee cellulari. Dopo primo isolamento il virus può essere facilmente adattato a linee cellulari quali fibroblasti di embrione di pollo (CEF), epatociti (CEL) o cellule VERO, andando in contro però ad attenuazione della patogenicità.

Le uova embrionate vanno inoculate a 6 giorni di incubazione nel sacco vitellino. Dopo 8 giorni, il liquido allantoideo e la membrana del sacco vitellino vanno omogeneizzati e reinoculati per il secondo passaggio. Dopo due o tre passaggi, si possono osservare emorragie embrionali e alcuni casi di mortalità. Qualora siano presenti lesioni a carico degli embrioni, il liquido prelevato dalle uova può essere inoculato su colture cellulari. In caso di campione positivo si può osservare un effetto citopatico, caratterizzato da focolai disseminati di cellule rotonde e dalla formazione di sincizi (Buys *et al.*, 1989a; Cook *et al.*, 1999).

A seguito dell'inoculazione del campione su TOC, l'eventuale presenza di AMPV sottotipo A o B, è dimostrata dopo 6-10 giorni, per la comparsa di cigliostasi e il picco del titolo virale è raggiunto all'incirca tra il terzo e il quinto giorno post-inoculazione (Cook *et al.*, 1991). Le TOC, preparate da embrioni "specific pathogen free" (SPF) di pollo o di tacchino, rappresentano il metodo di isolamento più usato per i sottotipi citati, per diversi motivi: innanzitutto questa tecnica è la più sensibile in primo isolamento (Naylor e Jones, 1993); è più economica rispetto alle uova embrionate, perché da una trachea è possibile ottenere numerose TOC; la cigliostasi rappresenta un criterio più obiettivo di valutazione di crescita virale rispetto alle lesioni embrionali. Questa tecnica ha però lo svantaggio di non permettere l'isolamento del sottotipo C in quanto esso non è cigliostatico (Cook *et al.*, 1999). In questo caso è perciò raccomandato, in primo

isolamento, l'uso delle uova embrionate (Cook, 2000a) o l'utilizzo di coltura cellulari quali QT-35 (Goyal *et al.*, 2000) o fibroblasti di pollo.

Recenti studi col sottotipo C hanno inoltre individuato altri substrati cellulari come possibile mezzo per la propagazione virale; Kong *et al.* (2006) riportano l'utilizzo di fibroblasti di tacchino nonché di colture cellulari derivanti da turbinati, reni e seni infraorbitali di embrioni di tacchino nonché da reni di pollo e della linea cellulare immortale DF-1, ottenuta anch'essa da embrioni di pollo. Tiwari *et al.* (2006) hanno testato con successo anche le linee BGM (Baby Grivet Monkey Kidney), BHK-21 (Baby Hamster Kidney) e MA-104 (sviluppata dal rene di African Green Monkey).

Poiché gli effetti osservati sui substrati utilizzati per l'isolamento sono caratteristici ma non esclusivi dell'AMPV, (ad esempio la cigliostasi su TOC per i sottotipi A e B può essere determinata anche da altri agenti quali l'IBV, il virus della malattia di Newcastle e i Micoplasmi, occorre confermare il sospetto di diagnosi mediante l'utilizzo di tecniche di identificazione virale. Queste ultime sono rappresentate da: virus neutralizzazione, immunofluorescenza (IF) (Jones *et al.*, 1988), immunoperossidasi (IP) (O'Loan e Allan, 1990; Catelli *et al.*, 1998) o osservazione diretta al microscopio elettronico (Giraud *et al.*, 1986; McDougall e Cook, 1986; Buys *et al.*, 1989a).

Va inoltre detto che alcuni dei primi isolamenti sono stati fatti inoculando in polli o tacchini SPF, o lo scolo nasale filtrato, o tessuti omogeneizzati e filtrati, di animali con sintomatologia respiratoria (McDougal e Cook, 1986; Picault *et al.*, 1987; Buys *et al.*, 1989)

Una volta isolato il virus si può procedere alla sua tipizzazione mediante l'uso di pannelli di anticorpi monoclonali (Cook *et al.*, 1993a; Collins *et al.*, 1993) o mediante l'applicazione di protocolli di Polymerase Chain Reaction (PCR), in grado di distinguere i diversi sottotipi virali sulla base delle differenze genotipiche che presentano (Juhász e Easton, 1994; Naylor *et al.*, 1997a; Dani *et al.*, 1999).

L'isolamento di AMPV in campo non è facile perché il virus persiste per un tempo molto breve dopo l'infezione: il titolo virale massimo lo si rileva infatti fra i 3 e i 5 giorni post infezione. Per tentare l'isolamento virale occorre quindi campionare soggetti che ancora non manifestano segni clinici o con una sintomatologia in fase iniziale (Cook e Cavanagh, 2002). Questo fattore è importante in particolar modo nel pollo, nel quale la sintomatologia si evidenzia tardivamente rispetto all'infezione in un periodo in cui il titolo virale è basso. Un ulteriore fattore che complica l'isolamento virale dal pollo è la possibile contemporanea presenza, in casi di malattia respiratoria, di altri agenti quali il virus della Bronchite Infettiva e della Malattia di Newcastle (Jones, 1996).

7.3 RICERCA DELL'ANTIGENE VIRALE

Un approccio più semplice di ricerca del virus prevede l'applicazione di tecniche immunoistochimiche, quali l'immunofluorescenza e l'immunoperossidasi, e della Polymerase Chain Reaction (PCR), per la individuazione degli antigeni virali direttamente su campioni di tessuti o da tamponi.

7.3.1 Immunofluorescenza e immunoperossidasi

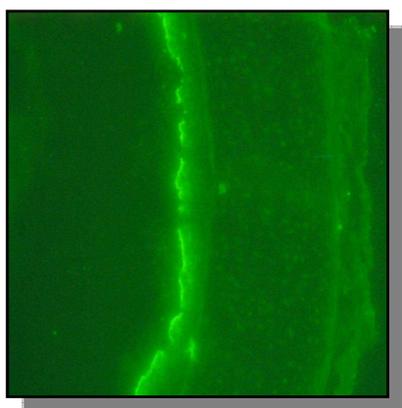


Figura 8.

Immunofluorescenza indiretta positiva per AMPV su sezione criostatica di trachea. (Archivio di Patologia Aviaria. Università di Bologna)

Le metodiche d' immunofluorescenza diretta o indiretta (Baxter-Jones, 1986) sono state utilizzate su sezioni di trachea e di turbinati nelle infezioni sperimentali, ma non in campioni provenienti dal campo. Paragonando i risultati ottenuti mediante questa prova con i dati ricavati dall'isolamento del virus è stato evidenziato un buon livello di corrispondenza tra le due metodiche. A suo favore l'immunofluorescenza (figura 8) presenta il vantaggio di essere di più veloce esecuzione rispetto all'isolamento virale; comunque la validità diagnostica nelle infezioni di campo non è ancora provata.

La tecnica di immunoperossidasi, messa a punto da O'Loan e Allan (1990), è di veloce esecuzione ma studi eseguiti da Catelli *et al.* (1998) suggeriscono che possa essere dotata di una scarsa sensibilità.

7.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Da una decina d'anni, anche per la diagnosi delle infezioni da AMPV è stata messa a punto la "Polymerase Chain Reaction" (PCR), preceduta dallo step della retrotrascrizione (RT), trattandosi di un virus ad RNA. La principale caratteristica di questa metodica è l'elevatissima sensibilità in quanto tratti predeterminati di RNA virale (target) vengono, trascritti a cDNA, quindi riprodotti in modo esponenziale e amplificati. In tal modo anche quantità molto piccole di virus possono essere rilevate in tessuti infetti, senza la necessità di passaggi preliminari in vitro. La specificità è condizionata dalla scelta di una sequenza nucleotidica che sia posseduta unicamente dall'AMPV (Cavanagh *et al.*, 1997). I

primi protocolli di RT-PCR sono stati messi a punto sulla sequenza nucleotidica del gene della proteina F (Jing *et al.*, 1993) e successivamente del N e G (Bayon-Auboyer *et al.*, 1999). Con la RT-PCR è stato possibile identificare il virus da tamponi sia tracheali che esofagei per un lungo periodo di tempo dopo l'infezione (17-19 giorni). In aggiunta, i tamponi essiccati e conservati per alcuni giorni a temperatura ambiente hanno dato gli stessi risultati del materiale mantenuto umido e congelato (Jing *et al.*, 1993). È comunque importante ricordare che la tecnica PCR rivela RNA virale, non il virus vivo, per cui il significato di una positività alla PCR in termini di determinazione di un'effettiva infezione, rimane da stabilire e da valutare anche in associazione ad altri strumenti diagnostici.

Oltre che a scopo diagnostico la RT-PCR riveste, come detto prima, un ruolo importante nella tipizzazione degli isolati virali. Naylor *et al.*, (1997b) ha sviluppato un protocollo diagnostico in grado di differenziare il sottotipo A dal B. Negli Stati Uniti è stato messo a punto un tipo di RT-PCR che amplifica un tratto del gene che codifica per la proteina M in grado di diagnosticare solamente il sottotipo C (Pedersen *et al.*, 2000). Esiste, inoltre, un protocollo di RT-PCR universale che amplifica un tratto del gene N, in grado di evidenziare tutti e 4 i sottotipi di AMPV attualmente conosciuti (Bayon-Auboyer *et al.*, 1999).

Le tecniche di biologia molecolare, in futuro, potrebbero permettere la differenziazione dei virus vaccinali dai virus di campo (Cook, 2000b). Cavanagh *et al.* (1999) sono stati in grado di differenziare il virus vaccinale del sottotipo B dai ceppi di campo mediante l'applicazione di una Nested RT-PCR su un tratto del gene F e successivo clivaggio mediante specifiche endonucleasi che ha prodotto due diversi pattern di restrizione. Infatti Cavanagh *et al.* (1999) hanno osservato che il ceppo vaccinale e i ceppi di campo differiscono per un nucleotide in posizione 979: l'adenosina sostituisce la guanina nel ceppo vaccinale. L'endonucleasi MboII, utilizzata in questa prova, presenta come sito di restrizione 'GAAGA (N)3' ed è in grado di tagliare il gene F di un ceppo di campo in posizione 937 e 991. Al contrario il gene F del virus vaccinale è tagliato solo in posizione 937 poiché la sostituzione della guanina con l'adenina (979) impedisce all'endonucleasi di riconoscere il secondo sito di restrizione (991).

Sono stati sperimentate anche Multiplex RT-PCR per la rilevazione contemporanea di più agenti virali a tropismo respiratorio, come ad esempio AMPV sottotipo C e NDV (Ali e Reynolds, 2000), ma anche AMPV-C, NDV e il virus dell'Influenza Aviaria (Malik *et al.*, 2004). Infine, ultimamente, si è riusciti ad utilizzare la tecnica quantitativa Real Time RT-PCR per la rilevazione di tutti e quattro i sottotipi del *Metapneumovirus* aviaria con ottimi risultati (Guionie *et al.*, 2007).

7.4 DIAGNOSI SIEROLOGICA

Le tecniche sierologiche che permettono di identificare gli anticorpi sierici specifici per AMPV sono l'immunofluorescenza indiretta (Jones *et al.*, 1986; Baxter-Jones *et al.*, 1989; O'Loan *et al.*, 1990), la sieroneutralizzazione con un ceppo virale di referenza (McDougall e Cook, 1986; Baxter-Jones *et al.*, 1989) e l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Chettle e Wyeth, 1988; Baxter-Jones *et al.*, 1989; O'Loan *et al.*, 1990).

Il primo metodo prevede l'utilizzo di organocolture di anelli tracheali o di sezioni tessutali su cui sono presenti gli antigeni virali, e di globuline anti-anticorpo coniugate con fluoresceina specie-specifiche (Baxter-Jones *et al.*, 1989).

La sieroneutralizzazione identifica gli anticorpi sierici basandosi sull'inibizione della replicazione del virus sul substrato. In presenza di anticorpi non si evidenziano le caratteristiche alterazioni tessutali virus indotte quali la cigliostasi su TOC. Questa tecnica è dotata di una sensibilità simile all'ELISA (Cook, 2000b), ma è lenta e indaginosa (Jones, 1996), per cui il suo utilizzo è limitato a prove di cross neutralizzazione tra i diversi ceppi virali o in alternativa all'immunofluorescenza, in indagini sierologiche su specie aviarie per le quali non sono disponibili le antiglobuline specifiche (Jones, 1996).

Per le indagini sierologiche di routine, queste metodiche sono state soppiantate dai test ELISA che offrono il vantaggio di essere rapidi, facilmente automatizzabili e non soggettivi (Baxter-Jones *et al.*, 1989). Esistono in commercio due tipi di test ELISA.

Il primo metodo è l'ELISA diretta in cui il siero da testare viene posto in appositi pozzetti su cui è adsorbito il virus. Successivamente sono aggiunte le antiglobuline specifiche per la specie in esame, marcate con l'enzima, che si legano agli eventuali complessi antigene-anticorpo formati. Infine la presenza e il titolo anticorpale sono evidenziati dall'aggiunta del cromogeno, su cui agisce l'enzima che, in caso di positività, sviluppa una reazione colorimetrica la cui intensità è misurata allo spettrofotometro.

La seconda metodica è definita ELISA "blocking" o "competitiva" e si basa sulla competizione tra gli anticorpi del siero da analizzare e anticorpi monoclonali (Mab)-anti AMPV nei confronti dell'antigene virale adsorbito alla piastra. Gli anti-anticorpi coniugati con l'enzima sono diretti contro i Mab che si legano all'antigene solo in assenza di immunoglobuline sieriche specifiche per l'AMPV. Questo secondo tipo ha il vantaggio di non richiedere l'uso di anti-anticorpi specie specifici e, quindi, di poter essere utilizzato per saggiare sieri di tutte le specie animali. In commercio è presente un Kit ELISA blocking in grado di evidenziare anticorpi anti-AMPV del sottotipo A e B ed è stato messo a punto un Kit analogo per il sottotipo C (Turpin *et al.*, 2003).

I Kit ELISA in commercio sono allestiti a partire da antigeni virali del sottotipo A, B o C. Eterodossi *et al.* (1995) hanno evidenziato l'importanza dell'antigene nel test ELISA, suggerendo che l'uso di un antigene inappropriato può portare a falsi negativi, a causa dell'incapacità di rivelare la presenza di anticorpi eterologhi. Infatti, comparando tre diversi Kit, mentre la specificità è risultata pari al 100% in tutti e tre, differenze sono state notate nell'ambito della sensibilità (Mekkes e de Wit, 1998). Il problema è stato analizzato anche da Jones *et al.* (2000) attraverso uno studio eseguito su polli e tacchini sottoposti a differenti protocolli vaccinali e infettati sperimentalmente allo scopo di testare i sieri con due diversi Kit ELISA, uno preparato con antigeni del sottotipo B (Kit 1) e l'altro con antigeni del sottotipo A (Kit 2). Nei tacchini, in seguito alla somministrazione ad un giorno di un vaccino del sottotipo A, il Kit 2 ha rivelato la presenza di anticorpi a 21 giorni, ma l'altro Kit ha dato esito negativo. In tacchini vaccinati con il sottotipo A ad un giorno, e sottoposti ad infezione di prova a 21 giorni con un virus del sottotipo B e sottoposti a prelievo ed esame sierologico a 35 giorni, entrambi i test hanno dimostrato una sensibilità simile. Infine entrambi i test hanno dato lo stesso risultato anche in tacchini non vaccinati e infettati a 21 giorni con il ceppo Francese del sottotipo B. Nei polli vaccinati con sottotipo A ad un giorno e testati per anticorpi specifici a 21, il Kit 2 è risultato molto più sensibile. Ciò si è verificato anche nei polli che hanno subito il challenge con AMPV sottotipo A. Invece, a seguito dell'infezione di prova con un virus del sottotipo B, entrambi i test hanno dimostrato una sensibilità simile (Jones *et al.*, 2000).

Per ovviare a tale problema, diverse sono le soluzioni possibili. Giacché l'utilizzo di due Kit (sottotipo A e sottotipi B) per ogni siero in esame implicherebbe un notevole aumento dei costi, un approccio potrebbe consistere nella messa a punto di un'ELISA bivalente sulla cui piastra sono adsorbiti gli antigeni virali di entrambi i sottotipi. Comunque, questo metodo potrebbe determinare una riduzione della sensibilità complessiva. L'utilizzo di un ELISA allestita con subunità virali, in cui sono presenti solo quegli antigeni importanti per rivelare la sierconversione, potrebbe fornire maggiori risultati. Infatti, la rimozione di antigeni virali irrilevanti, permettendo di inserire nel test le componenti di entrambi i sottotipi, potrebbe indurre un aumento della sensibilità (Jones *et al.*, 2000).

L'identificazione di altri sottotipi virali, come il sottotipo C, ha complicato il quadro e introdotto la possibilità che molte varianti di AMPV esistano, per ognuna delle quali potrebbe essere necessaria l'applicazione di un test ELISA con antigene omologo (Jones *et al.*, 2000). Negli Stati Uniti è stata messa a punto un'ELISA basata sulla proteina di matrice (M) di AMPV. È stata scelta questa proteina poiché il gene M è altamente conservato e presenta più del 98% di similarità tra ceppi dello stesso sottogruppo e il 73% tra ceppi dei sottogruppi A e B. È stato inoltre

dimostrato che tale proteina è dotata di attività antigenica, perché è stata evidenziata la presenza di anticorpi anti proteina M in sieri di animali in corso di infezioni di campo. Questa metodica è risultata molto sensibile in quanto ha evidenziato il 97,1% di soggetti infettati sperimentalmente, rispetto al 54,5% dell'ELISA usata di routine (Gulati *et al.*, 2000).

L'utilizzo di peptici sintetici come antigeni per l'ELISA sembra un approccio molto vantaggioso anche per APV per svariati motivi tra cui la facilità di sintesi della proteina e il relativo basso costo di produzione, l'alta riproducibilità del test. Alvarez *et al.* (2004) hanno messo a punto un test ELISA che utilizza come antigene la prima porzione della proteina N, altamente conservata nei sottotipi A, B e C. Tale test risulta universale poiché è in grado di rilevare anticorpi dei tre sottotipi. Il sottotipo D non è stato invece testato. Inoltre la scelta del peptide N come antigene per test sierologici sembra essere ottimale poiché tale proteina è espressa in quantità elevate durante l'infezione dell'ospite, risultando in un alto titolo anticorpale, come evidenziato da studi condotti sul virus respiratorio sinciziale bovino.

Da ultimo, Maherchandani *et al.* (2004), hanno svolto uno studio per valutare la possibilità di esaminare i sieri in pool nei test ELISA, evidenziando come l'uso di pool non comporti diminuzioni della probabilità di evidenziare gruppi di animali infetti e rappresenti una significativa riduzione dei costi.

8. CONTROLLO DELLA MALATTIA

La vaccinazione è l'unico metodo di controllo efficace delle infezioni da AMPV. I programmi vaccinali prevedono l'utilizzo di vaccini vivi attenuati e spenti. Sia i tacchini da carne che i broiler possono essere vaccinati ad 1 giorno, in incubatoio, o a 7 giorni, in allevamento, e questo è possibile anche in animali nati da madri immuni perché gli anticorpi materni, presenti fino alla terza settimana d'età, non interferiscono con la replicazione del virus vaccinale ed il conseguimento della protezione immunitaria (Naylor *et al.*, 1997b). Si utilizzano in questo caso vaccini vivi attenuati somministrati preferibilmente mediante instillazione oculo-nasale, che permette di far giungere il vaccino a contatto con le superfici mucose da proteggere, o spray a grosse gocce o acqua da bere. La vaccinazione con vaccini vivi stimola una risposta immunitaria locale assicurando la produzione di specifiche IgA e la comparsa di linfociti T citotossici antigene specifici. Al contrario la vaccinazione con vaccino vivo per via parenterale, induce la produzione di anticorpi umorali in assenza di un'evidenziabile risposta locale, ed è perciò inefficace nella protezione degli animali nei confronti della forma respiratoria (Sharma *et al.*, 2002). La via oculonasale è preferibile rispetto alla somministrazione mediante spray o nell'acqua da bere, poiché assicura che tutti gli animali assumano la stessa dose di vaccino. Una sola vaccinazione potrebbe essere in grado di proteggere i tacchini in accrescimento per tutta la loro vita (Cook, 2000a). È stato però dimostrato che la vaccinazione con ceppi attenuati del sottotipo A o B determina una completa protezione clinica da ceppi omologhi ed eterologhi per un periodo di tempo non superiore a 11 settimane. Per prolungare il periodo di protezione, giacché i tacchini terminano l'accrescimento a 17 settimane d'età, è quindi opportuno effettuare un richiamo vaccinale sempre con un vaccino vivo attenuato (Van de Zande *et al.*, 2000). A seconda della ditta produttrice è previsto un solo richiamo a 5-6 settimane d'età (dati Intervet), o più richiami, rispettivamente a 3 e a 7-9 settimane d'età, seguiti da una quarta vaccinazione, a 14 settimane, in zone ad alto rischio d'infezione (dati Merial). Nei broiler, invece, una sola vaccinazione può proteggere gli animali per tutta la vita produttiva (Cook, 2000a).

I programmi vaccinali per le pollastre e i riproduttori includono l'utilizzo di vaccini inattivati per proteggere adeguatamente la funzione riproduttiva. Numerosi studi, sia nella tacchina che nella gallina, hanno dimostrato come il solo vaccino vivo attenuato riduca il calo della deposizione, ma non basti per scongiurarlo totalmente. Al contrario il vaccino spento previene completamente tale aspetto, ma non è in grado di evitare la sintomatologia respiratoria (Cook *et al.*, 2000b). Perciò, in questi animali, la profilassi vaccinale prevede l'iniziale somministrazione di un vaccino vivo attenuato seguita dall'impiego di un vaccino

spento prima dell'inizio dell'ovodeposizione. Nella tacchina riproduttrice spesso si effettua un richiamo con vaccino vivo attenuato dopo 5-6 settimane dalla prima somministrazione. Se ben eseguiti, tali piani proteggono gli animali per tutto il ciclo produttivo (dati Intervet e dati Merial).

È stata anche studiata la possibilità di somministrazione del vaccino *in ovo* che nel tacchino ha fornito una completa protezione in animali sottoposti a challenge a 3-5 (Worthington *et al.*, 2000) e a 14 settimane di vita (Worthington *et al.*, 2003). Hess *et al.* (2004) hanno messo in evidenza come dopo vaccinazione *in ovo* i broiler mostrino titoli anticorpali più alti rispetto ad animali vaccinati a 1 giorno di vita, e come non sia possibile reisolare AMPV dopo la vaccinazione. Studi più recenti hanno evidenziato come in seguito a vaccinazione *in ovo* in polli e tacchini l'immunità umorale insorga rispettivamente a 5 e 8 giorni dalla schiusa e duri fino a 46 giorni nel pollo e 9 settimane nel tacchino (Tarpey e Huggins; 2007). Nel pollo si pone inoltre il problema della possibile interferenza del virus vaccinale della bronchite infettiva (IBV), sulla replicazione e l'efficacia di AMPV vaccinale. Studi effettuati da Cook *et al.* (2001) hanno evidenziato infatti che, somministrando un vaccino vivo attenuato della Bronchite infettiva 1 settimana prima rispetto a un vaccino vivo attenuato dell'AMPV, il reisolamento del ceppo vaccinale del *Metapneumovirus* aviare è ritardato e molto ridotto. Questa interferenza si evidenzia anche in una diminuzione della risposta anticorpale AMPV indotta. Sempre nel pollo Ganapathy *et al.* (2005) hanno studiato l'interazione delle vaccinazioni con virus vivi per NDV e AMPV somministrati contemporaneamente, notando come i livelli anticorpali sierici per quest'ultimo fossero più bassi rispetto alla somministrazione singola; va detto però che gli anticorpi presenti nel fluido lacrimale non mostravano variazioni. Nonostante ciò il challenge con ceppi virulenti ha dimostrato che la contemporanea somministrazione vaccinale con AMPV e NDV determina una completa protezione (Ganapathy *et al.*, 2007).

Diversi studi sono stati condotti allo scopo di valutare il grado di cross-protezione tra i vari sottotipi, giacché i vaccini vivi in commercio sono costituiti da ceppi virali di tipo A, B o C (Giraud *et al.*, 1987; Cook *et al.* 1989a; Patnayak e Goyal, 2004). È stata dimostrata in linea di massima una buona protezione crociata tra i sottotipi A e B (Cook *et al.*, 1995; Eterodossi *et al.*, 1995; Toquin *et al.*, 1996). Van de Zande *et al.* (2000) hanno però evidenziato una non completa protezione nei confronti del virus eterologo da parte di entrambi i sottotipi. In animali vaccinati a due settimane e infettati a 11 settimane è stato osservato un maggior grado di replicazione virale, rispetto a soggetti infettati a 5 settimane. Ciò indica che la cross-protezione diminuisce nel corso di questo periodo (Van de Zande *et al.*, 2000). Infine i ceppi vaccinali A e B sono in grado di indurre protezione nei confronti del sottotipo C e del ceppo non A/non B isolato in Francia

(Toquin *et al.*, 1999). Al contrario la vaccinazione eseguita con il sottotipo C riduce la comparsa di segni di malattia conseguenti a un challenge con un virus virulento del sottotipo A, ma non del sottotipo B (Cook *et al.*, 1999).

Negli Stati Uniti sono stati studiati vaccini termosensibili, adattati a crescere a basse temperature; AMPV è infatti un virus a stretto tropismo respiratorio e sembrerebbe un candidato ideale per questo tipo di vaccino. Diversi studi hanno mostrato come, in seguito a challenge, nonostante il livello anticorpale sierico fosse relativamente basso, gli animali vaccinati, non solo non manifestassero sintomatologia, ma non si evidenziasse neppure eliminazione virale; la protezione conferita da tali vaccini sembra durare anche 15 settimane (Patnayak e Goyal, 2004).

Per la profilassi di alcune patologie aviari vengono usati vaccini vivi naturalmente attenuati: è il caso ad esempio del ceppo La Sota per la Pseudopeste. Sono stati sperimentati anche per il *Metapneumovirus* isolati virali che si sono dimostrati apatogeni. Bennett *et al.* (2005) hanno isolato da un'oca canadese un ceppo con un gene G particolarmente grande, il più grande osservato in tutto il genere *Metapneumovirus*. L'inoculazione di tale virus in tacchini ha dato infezione ma non sintomatologia, e un successivo challenge con ceppo di campo virulento ha mostrato una lieve sintomatologia solo nel 33% degli animali, mentre gli altri non hanno sviluppato alcun sintomo. Anche il ceppo anatra isolato in Francia (Toquin *et al.*, 1999), si è dimostrato apatogeno per i tacchini e potrebbe essere oggetto di studi futuri per tale fine (Toquin *et al.*, 2006b). Tuttavia ulteriori ricerche saranno necessarie per capire se questa via può essere una reale opportunità per lo sviluppo di nuovi vaccini.

Dal momento che il *Metapneumovirus* aviare è un virus a RNA geneticamente instabile, va attentamente considerata la possibilità che i ceppi virali attenuati vadano incontro, nel tempo, ad una reversione a virulenza (Jones, 1996). La sequenziatura dell'intero genoma di due ceppi vaccinali e dei corrispondenti ceppi progenitori ha dimostrato la presenza di regioni alterate dal processo di attenuazione. Eseguendo molteplici passaggi seriali di un vaccino vivo in condizioni sperimentali, il virus riacquista capacità di provocare malattia e il suo genoma, in corrispondenza delle sopra citate regioni, riacquista le caratteristiche del progenitore (Naylor *et al.*, 2002). Catelli *et al.* (2006) hanno dimostrato la reversione a virulenza di un vaccino sottotipo A isolato durante un focolaio di TRT in tacchini di 18 giorni che inoculato in soggetti in condizioni biologiche è stato in grado di riprodurre malattia riferibile a TRT. Questa possibilità è stata recentemente confermata da Ricchizzi *et al.*, (2008) che riporta un focolaio di TRT da AMPV di origine veccinale in tacchini di 7 settimane.

Attualmente le ricerca stanno sempre di più tendendo alla messa a punto di vaccini ottenuti mediante tecniche di biologia molecolare. Qingzhong *et al.* (1994)

hanno ottenuto un vaccino dotato di una certa efficacia, mediante la tecnica del DNA ricombinante applicata sul virus del vaiolo aviario e il gene della proteina F dell'AMPV, uno dei maggiori immunogeni (Yu *et al.*; 1994), che veniva espressa in superficie come antigene maggiore. Tarpey *et al.* (2001) hanno indotto l'espressione del gene F del sottotipo C da parte del DNA plasmidico ed hanno studiato quale fosse il tipo di risposta immunitaria sviluppata nei tacchini. In seguito a due iniezioni intramuscolari di tale plasmide è stata evidenziata, mediante un'ELISA specifica per il sottotipo C, una risposta anticorpale omologa. È stato osservato inoltre che tali anticorpi possono riconoscere anche il sottogruppo A di AMPV, ma non sono in grado di neutralizzare né isolati del sottotipo C, né del sottotipo A o B. Infine, a seguito di un challenge con un ceppo Colorado virulento, non è stata evidenziata una protezione clinica significativa ma solo una risposta sierologica anamnestic. Ciò suggerisce che quella indotta sia solo una risposta immunitaria sistemica ma non locale. Al contrario Kapczynski e Sellers (2003) hanno testato la vaccinazione con DNA plasmidico esprimente il gene F o N. Gli autori hanno ottenuto con solo con il gene F una protezione significativa dopo challenge con AMPV, con limitata escrezione virale e assenza di segni clinici, mentre il gene N ha conferito protezione nulla. Studi analoghi sono stati eseguiti, in seguito, anche da altri ricercatori americani (Govindarajan *et al.*; 2006). Inoltre Chary *et al.* (2005) hanno valutato l'efficacia di vaccini ricombinanti utilizzando le proteine N e M in associazione o singolarmente; la somministrazione intramuscolare ha determinato una protezione del 100% in seguito a infezione di prova.

Infine Naylor *et al.* (2004) hanno messo a punto un sistema di *reverse genetics* che permette di modificare il genoma del *Metaneumovirus* aviario introducendo mutazioni in punti specifici, o eseguendo delezioni o inserzioni di interi geni, ed ottenere cloni infettivi modificati geneticamente. Tale sistema potrà permettere la produzione di una nuova generazione di vaccini vivi più stabili ed efficaci di quelli attualmente disponibili.

A tutt'oggi l'eradicazione del virus da zone endemiche con alta densità di allevamenti avicoli risulta impossibile. Troppo poco, infatti conosciamo sull'ecologia virale, ad esempio non sappiamo ancora quale sia il serbatoio di tale malattia e il meccanismo di trasmissione non è ancora del tutto chiarito. I vaccini inoltre sono sì un ottimo mezzo di controllo però hanno mostrato una certa instabilità e non sempre conferiscono una perfetta cross-protezione fra i diversi sottotipi (Cook, 2000). Sono pochi i casi di eradicazione di AMPV riportati. In Colorado ad esempio è stata possibile grazie a una stretta applicazione delle norme di biosicurezza e a buone pratiche di gestione degli allevamenti (Cook, 2000). In Svezia inizialmente si tentò di bloccare l'epizootia con lo stamping out di tutti gli animali colpiti, rigide restrizioni nei movimenti e contatti fra gli allevamenti

colpiti, nonché un minuzioso piano di screening epidemiologico sia sierologico che con RT-PCR degli allevamenti apparentemente non colpiti. Nonostante ciò si manifestarono nuovi focolai di infezione e si decise quindi di cambiare misure sanitarie e di effettuare una vaccinazione di massa, che si rivelò cruciale nell'eradicazione del virus dal paese scandinavo (Engstrom *et al.* 2000). Va tuttavia precisato che sia il Colorado che la Svezia possiedono una popolazione avicola ridotta, rispetto ad altre aree come ad esempio il Nord Italia o il Minnesota.

PARTE SPERIMENTALE

STUDIO A

STUDI LONGITUDINALI DI CAMPO

A.1. INTRODUZIONE

Le prime segnalazioni di TRT in Italia sono riportate negli anni 1987-88 (Fabris e D'Aprile, 1990; Franciosi C., comunicazione personale) e la tipizzazione molecolare dei primi isolati ha mostrato come appartenessero al sottotipo B (Juhasz e Easton, 1994). Da allora la malattia ha continuato ad essere osservata (Fabris *et al.*, 1998) ed è comparsa anche nel pollo e nel fagiano (Catelli *et al.*, 2001). Indagini epidemiologiche più recenti, svolte dapprima in aree del Veneto ad elevata vocazione avicola e, successivamente, estese ad allevamenti del centro Italia hanno confermato l'ampia diffusione del sottotipo B ed evidenziato, per la prima volta nel 2003, la presenza del sottotipo A (Catelli *et al.*, 2002, 2004; Cecchinato *et al.*, 2003).

Per la profilassi della TRT, sin dall'inizio degli anni '90, sono stati ampiamente utilizzati vaccini vivi attenuati; fra quelli disponibili nel nostro Paese, quello maggiormente utilizzato apparteneva al sottotipo B. Nei primi anni, allo scopo di determinare la migliore modalità di somministrazione, il vaccino è stato impiegato a "spot", per via oculare o spray, a dosi variabili e non standardizzate a seconda della percezione del problema. Solo dalla fine del 2001 la vaccinazione ha cominciato ad essere praticata a tappeto, ad un giorno di vita, via spray, in incubatoio ed ha tenuto in gran parte la malattia sotto controllo.

Nonostante la diffusione a tappeto della pratica vaccinale, recenti dati epidemiologici (Catelli, 2006) hanno mostrato come si riscontrino ancora con una certa frequenza focolai di malattia. Infatti, nonostante siano diminuite complessivamente negli anni le positività per AMPV, si è verificato un aumento del numero dei focolai in età avanzata (43-90 giorni di età), anche in animali

vaccinati correttamente e con vaccino del medesimo sottotipo virale causa del focolaio.

Allo scopo di ottenere informazioni sulla dinamica delle infezioni da AMPV nei gruppi vaccinati, in questo primo studio sono state eseguite due indagini longitudinali in gruppi di tacchini da carne vaccinati al primo giorno di vita per la TRT con vaccino sottotipo B. Abbinando tecniche diagnostiche molecolari ad isolamento virale, i gruppi sono stati monitorati due volte la settimana per la presenza di AMPV in associazione o meno a forme respiratorie, fino all'età di 14 settimane. Al fine di differenziare virus di campo da quelli di origine vaccinale, ceppi selezionati sono stati caratterizzati in porzioni genomiche *marker* ed analizzati dal punto di vista filogenetico.

A.2. MATERIALI E METODI

A.2.1. Gruppi oggetto d'indagine e campionamento

Sono stati oggetto di indagine due gruppi di tacchini da carne situati in Veneto. I gruppi sono stati denominati A e B e sottoposti a vaccinazione per AMPV via spray in incubatoio, con vaccino vivo attenuato sottotipo B, quindi campionati per indagini diagnostiche per AMPV.

Considerando che l'infezione da AMPV ha una morbilità che facilmente raggiunge il 100% (Stuart, 1989) e quindi prevalenze attese sicuramente superiori al 25%, e che la popolazione di ciascun gruppo era > 3500 soggetti, 10 campioni per gruppo erano sufficienti per evidenziare l'infezione con un livello di confidenza del 99% (Canon e Roe, 1982). Due volte la settimana, sino a 14 settimane di età, sono stati eseguiti tamponi rinofaringei, da 10 soggetti per gruppo, scelti



Figura A.1. Modalità di esecuzione di un tampono rinofaringeo.

casualmente; da ogni animale venivano raccolti due tamponi destinati uno all'isolamento virale e l'altro all'evidenziazione del virus mediante RT-nested PCR sottotipo A e B specifica. I tamponi rinofaringei erano eseguiti penetrando nelle cavità nasali tramite la fessura palatina, come illustrato in figura A.1., quindi aderendo al faringe con movimenti rotatori. I tamponi per RT nested-PCR (paragrafo A.2.2) erano lasciati asciugare per almeno 20 minuti all'aria allo scopo di

limitare la crescita di batteri e/o muffe, successivamente erano riposti nel loro contenitore e trasportati in laboratorio a temperatura ambiente. I tamponi destinati all'isolamento virale (paragrafo A.2.3.) erano immediatamente immersi in una provetta sterile contenente 4 ml di terreno MEM SF 10X, e mantenuti a temperatura di refrigerazione fino alla preparazione dell'inoculo che avveniva appena giunti in laboratorio.

A.2.2. RT nested-PCR sottotipo A e B specifica per diagnosi e tipizzazione di AMPV

I tamponi per RT nested-PCR sono stati processati in pool da 10.

A.2.2.a Estrazione dell'RNA virale

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata secondo Li *et al.* (1993), e prevedeva l'utilizzo di *Solution D* contenente Guanidina Tiocianato.

Preparazione della *Solution D*

Dapprima è stata preparata la *Stock solution* come riportato di seguito:

- 100 g di guanidina tiocianato (Guanidine thiocyanate for molecular biology, $\geq 99\%$, Cat. N. G9277-110G, Sigma[®]);
- 7.04 ml di citrato di sodio 0.75 M (Citric acid, Cat. N. C-3434, Sigma[®]) (ph 7);
- 10.5 ml di N-Lauroylsarcosine al 10% (N-Lauroylsarcosine, Cat. N. L-5000, Sigma[®]);
- 117 ml H₂O deionizzata o distillata.

La *Stock solution* veniva agitata su piastra riscaldata a 40°C sino a completa dissoluzione. La *Solution D* veniva ottenuta aggiungendo 7 µl di 2-mercaptetanol (2-mercaptoethanol, β-mercaptoetanol 98%, Cat. N. M-3148, SIGMA[®]) ad ogni ml di *Stock solution*.

Estrazione dell'RNA da tamponi

Per la processazione di un campione costituito da un pool di 10 tamponi si procedeva come di seguito descritto:

- si versavano 1 ml di *Solution D* in una provetta acido resistente con tappo a vite
- si immergevano i tamponi, per 1-2 secondi, uno per volta, nella *Solution D*
- si re-immolgevano i tamponi una seconda volta e per un tempo maggiore, avendo cura di comprimerli accuratamente sulla parete della provetta
- il campione in *Solution D* veniva posto a -80°C per almeno 2 ore
- si procedeva quindi allo scongelamento veloce in acqua a temperatura ambiente
- in un'altra provetta, identica alla precedente, venivano posti: 40 µl di acetato di sodio 2M a ph 4,1; 520 µl di Fenolcloroformio, quindi aggiunti 400 µl del campione in esame
- la provetta veniva vortexata per 5-10 sec. e successivamente centrifugata a 14.000 rpm per 5 min
- il campione risultava ora diviso in due fasi; la superiore veniva trasferita in una nuova provetta tipo "eppendorf" da 1,5 ml ed ad essa veniva aggiunto un volume uguale di isopropanolo (2-propanol 99.5%)

- la eppendorf veniva quindi rovesciata per un paio di volte, per mescolarne il contenuto, prima di essere posta a -20° C per 12 ore
- il campione, dopo essere stato rimosso dal freezer, veniva centrifugato a 14.000 rpm per 15 min
- il contenuto della provetta veniva delicatamente eliminato, facendo attenzione a non perdere il pellet eventualmente formatosi sul fondo, ed il precipitato veniva lavato con 1 ml di etanolo al 100%, e lasciato asciugare per 10 minuti.
- il precipitato veniva risospeso in 30 µl di acqua per biologia molecolare, poi utilizzato nella reazione di retrotrascrizione.

A.2.2.b. RT nested-PCR

Per evidenziare AMPV dall'RNA estratto dai tamponi rinofaringei è stata impiegata la RT nested-PCR descritta da Cavanagh *et al.* (1999), disegnata sulle sequenze del gene che codifica per la proteina G (Juhasz e Easton, 1994).

Retrotrascrizione (RT)

Per la reazione di retrotrascrizione dell'RNA a DNA veniva preparata una mix di reazione di volume finale di 10 µl costituita da: 2 µl di Improm-IITM 5X Reaction Buffer (Promega); 1.2 µl MgCl₂; 0.5 µl di dNTP (Promega); 2.8 µl di H₂O per biologia molecolare (SIGMA); 0.25 µl di RNAsin® Plus RNase Inhibitor (Promega); 0.5 µl di Improm-IITM Reverse Transcriptase (Promega), e 0.75 µl di oligonucleotide G6- (10 pmol/µl). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA) e 2 µl dell'RNA risospeso. La reazione era ottenuta tramite incubazione in termociclatore per 60 minuti a 42°C e per 5 minuti a 94°C.

Nested-PCR

La “nested PCR” è un protocollo in cui si eseguono due amplificazioni successive denominate PCR 1 e PCR 2. Il primo amplificato viene utilizzato come template su cui far avvenire la seconda reazione, utilizzando oligonucleotidi interni rispetto alla precedente. Nel protocollo da noi utilizzato, i *primers* della PCR 1, Gstart+ e G6-, sono detti “universali”, in quanto sono in grado di amplificare una porzione del gene G comune ai Metapneumovirus aviari sottotipo A e B. I 3 *primers* per la PCR 2 sono in grado di evidenziare e differenziare AMPV-A e AMPV-B. Il *primer* antisenso G5- è comune ai sottotipi A e B, ed i due *primers*

senso sono specifici, uno per il sottotipo A (G8+A) in grado di generare un frammento di 268 bp, e l'altro specifico per il sottotipo B (G9+B) in grado di generare un frammento di 361 bp (figura A.2.).

PCR 1

Per la PCR 1, del volume finale di 25 μ l, è stata utilizzata la seguente mix: 2.5 μ l di 10X Buffer (Fisher Molecular Biology); 1 μ l di $MgCl_2$ (25 mM); 0.5 μ l dNTP (Promega); 18.875 μ l di H_2O per biologia molecolare (SIGMA); 0.5 μ l (10 pmol/ μ l) di ciascun *primer* (Gstart+ e G6-) e 0,125 μ l di Amplibiotherm DNA Polymerase (Fisher Molecular Biology). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA[®]) e 1 μ l di prodotto della RT (cDNA). Il termociclatore era programmato come segue: predenaturazione a 94°C per 15 sec.; 35 cicli di amplificazione caratterizzati da 1 fase di denaturazione a 94°C per 15 sec; appaiamento a 50°C per 20 sec. ed estensione a 72°C per 40 sec.

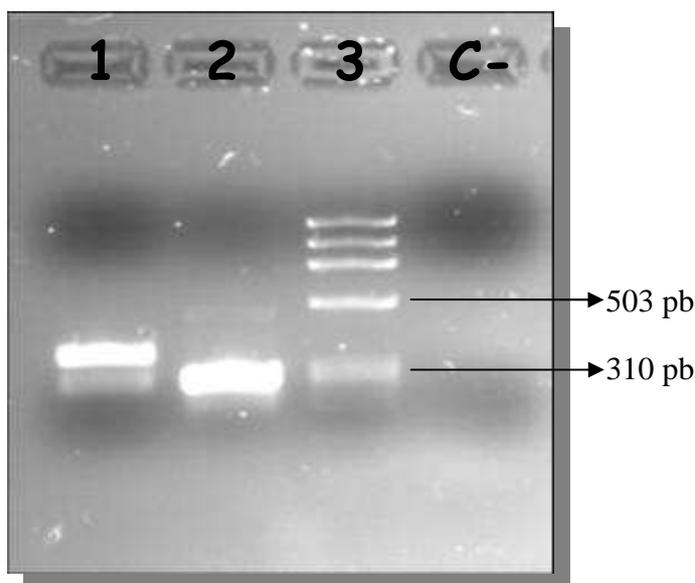


Figura A.2. Elettroforesi in gel di agarosio di amplificati da RT Nested-PCR per AMPV sottotipo A e B. DNA Marker (linea 3); prodotti da AMPV sottotipo B (linea 1: amplificato di 361 pb) e sottotipo A (linea 2: amplificato di 268 pb).

PCR 2

Per la PCR 2 veniva utilizzata una mix identica a quella della PCR1 ad esclusione dei *primers* utilizzati (G8+A, G9+B, G5). A tale mix venivano aggiunti 0,5 μ l del prodotto della PCR1. Questa fase veniva eseguita con estrema cautela dato il rischio di contaminazione dovuta alla manipolazione di un amplificato. La mix di reazione con il campione veniva sottoposta allo stesso ciclo di amplificazione

descritto per la PCR 1. I risultati della amplificazione erano visualizzati con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con Bromuro di Etidio. Per evidenziare l'andamento della corsa (figura A.2.), a 5 μ l di campione è stato

aggiunto 1 µl di blu di bromofenolo. La specificità del prodotto è stata valutata con l'uso di un *marker* di riferimento (φX174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen).

A.2.3. Isolamento AMPV su colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC)

L'isolamento virale è stato eseguito su colture di anelli tracheali di embrione di pollo (TOC). Queste sono state preparate a partire da uova embrionale di pollo specific pathogen free (SPF) al 18-20° giorno di incubazione. AMPV è in grado d'infettare e successivamente produrre ciliostasi in queste colture osservabili con microscopio ottico rovesciato.

L'isolamento virale è stato eseguito solo dai tamponi in MEM SF i cui corrispettivi tamponi a secco erano risultati positivi per AMPV alla RT nested PCR.

A.2.3.a Preparazione del terreno di coltura Minimum Essential Medium Free Serum (MEM-SF)

Nelle TOC è stato utilizzato terreno di coltura MEM privo di siero animale (SF), addizionato con Penicillina e Streptomicina. Nella preparazione è stato impiegato MEM 10X, bicarbonato di sodio al 7,5% P/V, per portare il terreno al pH finale di 7,2, ed acqua deionizzata sterile per portare a volume. E' stata aggiunta soluzione antibiotica Penicillina-Streptomicina, per ottenere una concentrazione antibiotica finale di 200 unità di Penicillina G sodica e 200 microgrammi di Streptomicina solfato per ml di terreno. Come terreno di trasporto è stato invece utilizzato MEM-SF ad una concentrazione antibiotica 10 volte maggiore (MEM-SF 10X).

Successivamente 500 µl di MEM-SF sono stati distribuiti in provette di vetro sterili con micropipetta di precisione. Ogni provetta contenente terreno di coltura è stata accuratamente chiusa con un tappo di silicone sterile, dopodiché tutte le provette sono state poste nel tamburo rotante per provette ed incubate ad una temperatura di $38 \pm 1^\circ\text{C}$ in frigotermostato.

A.2.3.b. Preparazione delle TOC

Estrazione degli embrioni dalle uova

Le uova embrionate sono state sperate e quelle con embrione morto o chiare eliminate. Il guscio è stato disinfettato con etanolo al 70% e, non appena l'etanolo è evaporato, con un paio di pinze si è rotto il guscio in corrispondenza della camera d'aria. Messa in evidenza la membrana testacea si è proceduto alla sua asportazione, all'estrazione dell'embrione tramite pinze chirurgiche ed alla sua soppressione mediante recisione del midollo allungato.

Prelievo delle trachee

Ogni embrione morto è stato posto in una capsula Petri di vetro in posizione supina e, mediante taglio della cute del collo dalla base del becco all'ingluvie, è stata esposta la trachea. Il tessuto connettivo che circonda la trachea è stato accuratamente rimosso con pinze a punta sottile e la trachea asportata e posta in una tubo di vetro sterile contenente MEM-SF. È importante asportare dalle trachee quanto più connettivo possibile per facilitare la fase di taglio e perché i fibroblasti, replicandosi in coltura, potrebbero riempire il lume tracheale ed ostacolare l'osservazione della motilità ciliare.

Taglio delle trachee

Si esegue il taglio utilizzando un sezionatore di tessuti per colture d'organo,

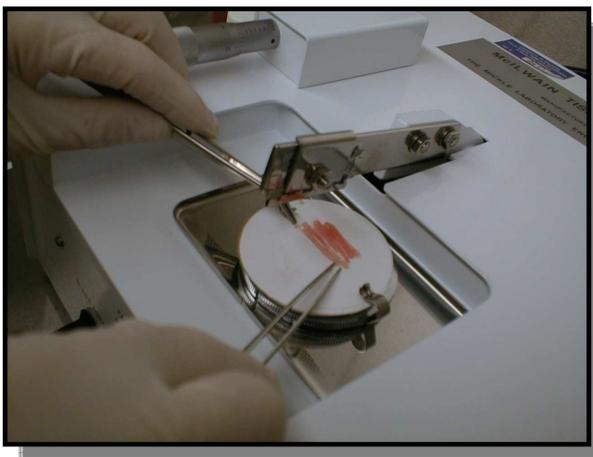


Figura A.3. Preparazione delle trachee per il taglio.

dotato di un braccio di taglio su cui è inserita una normale lametta da barba. Le trachee sono state ulteriormente ripulite dai residui di tessuto connettivo. Successivamente, utilizzando due paia di pinze appuntite, ogni trachea è stata leggermente stirata e posizionata, in modo perpendicolare alla lama, su dischi di carta da filtro posti sul supporto di taglio circolare (figura A.3.). Sopra al disco possono essere distese, l'una accanto all'altra, più trachee per tutta la lunghezza della lama. Infine, per

prevenire che gli anelli tracheali aderiscano alla lama di taglio, sono stati bagnati con qualche goccia di terreno di coltura. Le trachee sono state poi tagliate ottenendo sezioni trasversali dello spessore di circa 500 μm .

Distribuzione delle TOC nelle provette

Ogni anello tracheale ottenuto è stato delicatamente trasferito, con l'aiuto di pinze a punta sottile, nelle provette di vetro sterili contenenti 500 μl di MEM-SF, precedentemente preparate. Ogni provetta deve contenere un solo anello tracheale e deve essere accuratamente chiusa con un tappo di silicone sterile. Le provette sono state quindi riposte nel tamburo rotante, predisposto a compiere 8 giri/ora, e collocate in frigotermostato a $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

A.2.3.c. Inoculazione TOC

Selezione TOC

A 24 ore dalla preparazione, ogni coltura è stata agitata mediante agitatore per provette per liberare il lume da impurità che potrebbero ostacolare l'osservazione del battito ciliare, quindi selezionata in base all'osservazione, al microscopio rovesciato (10X e 40X), della motilità ciliare dell'epitelio del lume tracheale. Sono state ritenute idonee all'inoculazione solo le TOC che con battito ciliare uniforme in tutto il perimetro dell'anello tracheale.

Preparazione inoculo

Il contenitore coi tamponi prelevati in campo veniva agitato con l'aiuto di un agitatore per provette per 10 secondi, per favorire il rilascio del materiale organico nel terreno. Il terreno era poi trasferito in una provetta conica per centrifuga e centrifugato per 10 minuti a $+4^\circ\text{C}$ a 2400 rpm. Il surnatante era poi prelevato e filtrato con filtro millipore da 0.45 μm per ridurre l'eventuale contaminazione batterica e micotica. Se l'inoculazione non veniva eseguita immediatamente il campione, così preparato veniva stoccato a temperatura di -80°C .

Inoculazione

Prima dell'inoculazione le TOC selezionate erano private del terreno di coltura e l'anello tracheale veniva posto sul fondo della provetta. Ogni coltura è stata quindi inoculata con 0,1 ml del campione in esame; sono state utilizzate dieci TOC per campione. Dopo adsorbimento dell'inoculo per circa un'ora in frigo termostato, a

ciascuna TOC venivano aggiunti 0,5 ml di terreno MEM SF. Le TOC inoculate erano quindi riposte nuovamente in tamburo rotante e messe in frigotermostato a temperatura di incubazione ($38 \pm 1^\circ\text{C}$). Cinque TOC non inoculate, sono state tenute come controllo negativo.

Lettura TOC inoculate

Giornalmente le colture inoculate e i controlli negativi sono stati osservati al microscopio ottico rovesciato (figura A.4.) per valutare la motilità ciliare. Dopo 4 giorni, il terreno di 5 TOC per ogni campione veniva raccolto, aliquotato e posto nel freeze -80°C per ulteriori passaggi. Le restanti colture sono state osservate fino a 7-10 giorni post-inoculazione per valutare l'eventuale comparsa di ciliostasi. I controlli negativi devono presentare battito ciliare vigoroso per tutto il periodo d'osservazione. I campioni mostravano attività ciliostatica erano considerati positivi e la conferma dell'isolamento virale era data dalla RT PCR (paragrafo A.2.3.).

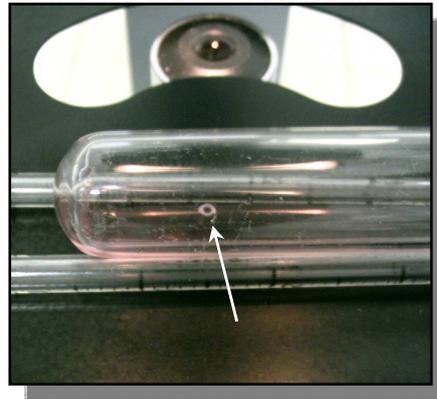


Figura A.4. Anello tracheale (freccia)

A.2.4. Differenziazione fra ceppi di campo e vaccinali

Allo scopo di chiarirne l'origine vaccinale o di campo, ceppi AMPV selezionati fra quelli isolati nel corso dello studio sono stati sequenziati a livello dei geni F e G e paragonati con sequenze analoghe del vaccino sottotipo B somministrato agli animali e 6 ceppi AMPV italiani isolati dal 2001 al 2007 (tabella B.1.).

A.2.4.a. Estrazione dell'RNA ed RT PCR

La metodica utilizzata per l'amplificazione dei geni F e G verrà riportata successivamente in dettaglio nel paragrafo B.2.2.

A.2.4.b. Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) attenendosi alle istruzioni riportate dal produttore. I frammenti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni presso il centro BMR Genomics di Padova con il sequenziatore automatico 3730xl DNA

Analyzer (Applied Biosystems, USA). Le sequenze nucleotidiche sono state poi allineate e assemblate utilizzando il software Bioedit Sequence Alignment Editor. I ceppi sono stati allineati, utilizzando Clustal W, con sei ceppi Italiani di AMPV sottotipo B isolati dal 2001 al 2007. L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo *neighbour-joining* col software MEGA4. I valori di *bootstrap* erano ottenuti con 1000 replicati e sono stati considerati significativi solo quelli > 70 , che corrispondono ad un intervalli di confidenza $>95\%$.

A.3. RISULTATI

I risultati degli esami di RT nested-PCR ed isolamento virale per AMPV sono riportati nella tabella A.1. Nell'indagine è sempre stato evidenziato AMPV sottotipo B, lo stesso utilizzato nella vaccinazione. Sia nell'allevamento A che nel B la RT nested PCR ha evidenziato positività precoci (ai giorni 22, 26, 29 in A e 14, 15, 19, 22, 26, 29 in B) e tardive, a 70 giorni di vita. Queste ultime positività erano sempre associate a sintomatologia respiratoria riferibile a TRT. L'isolamento virale ha avuto successo su un numero più limitato di campionamenti in particolare nell'allevamento A ai giorni 19 e 70 mentre in B 19 e 29.

Tabella A.1. Risultati della RT Nested-PCR ed isolamento virale per AMPV negli studi longitudinali.

Età (giorni)	Allevamento A		Allevamento B	
	RT PCR	Isolamento	RT PCR	Isolamento
1	vaccinazione sottotipo B			
3	-	/	-	/
7	-	/	-	/
14	-	/	B	-
15	-	/	B	-
19	-	/	B	+
22	B	-	B	-
26	B	-	B	-
29	B [§]	+	B [§]	+
33	-	/	-	/
35	-	/	-	/
40	-	/	-	/
43	-	/	-	/
47	-	/	-	/
49	-	/	-	/
52	-	/	-	/
57	-	/	-	/
59	-	/	-	/
66	-	/	-	/
70	B ^{*§}	+	B [*]	-
74	-	/	-	/
84	-	/	-	/
94	-	/	-	/

(-) negativo per AMPV

(/) esame non eseguito

(B) positivo a RT-Nested PCR sottotipo B

(+) positivo all'isolamento su TOC

(*) forma respiratoria

(§) sequenziato per differenziazione fra ceppi vaccinali e di campo

Per la differenziazione dell'origine vaccinale o di campo dei ceppi è stata eseguita l'analisi filogenetica del gene G completo e della prima porzione del gene F. L'amplificazione e l'analisi di sequenza è stata eseguita su un isolato precoce (IT/Ty/129-08/04) ed uno tardivo (IT/Ty/129-18/04) dell'allevamento A ed un unico isolato precoce dell'allevamento B (IT/Ty/132-08/04). Gli alberi filogenetici ottenuti, sia dal gene F che G (figura A.5.), mostrano come i due isolati ottenuti da animali di 4 settimane formino un cluster unico col vaccino, mentre l'isolato da tacchini di 10 settimane cada nel cluster con gli altri ceppi di campo italiani sottotipo B. Tutti i cluster sono supportati da alti valori di bootstrap. Gli isolati precoci sono quindi con ogni probabilità di origine vaccinale, mentre il tardivo è un vero ceppo di campo.

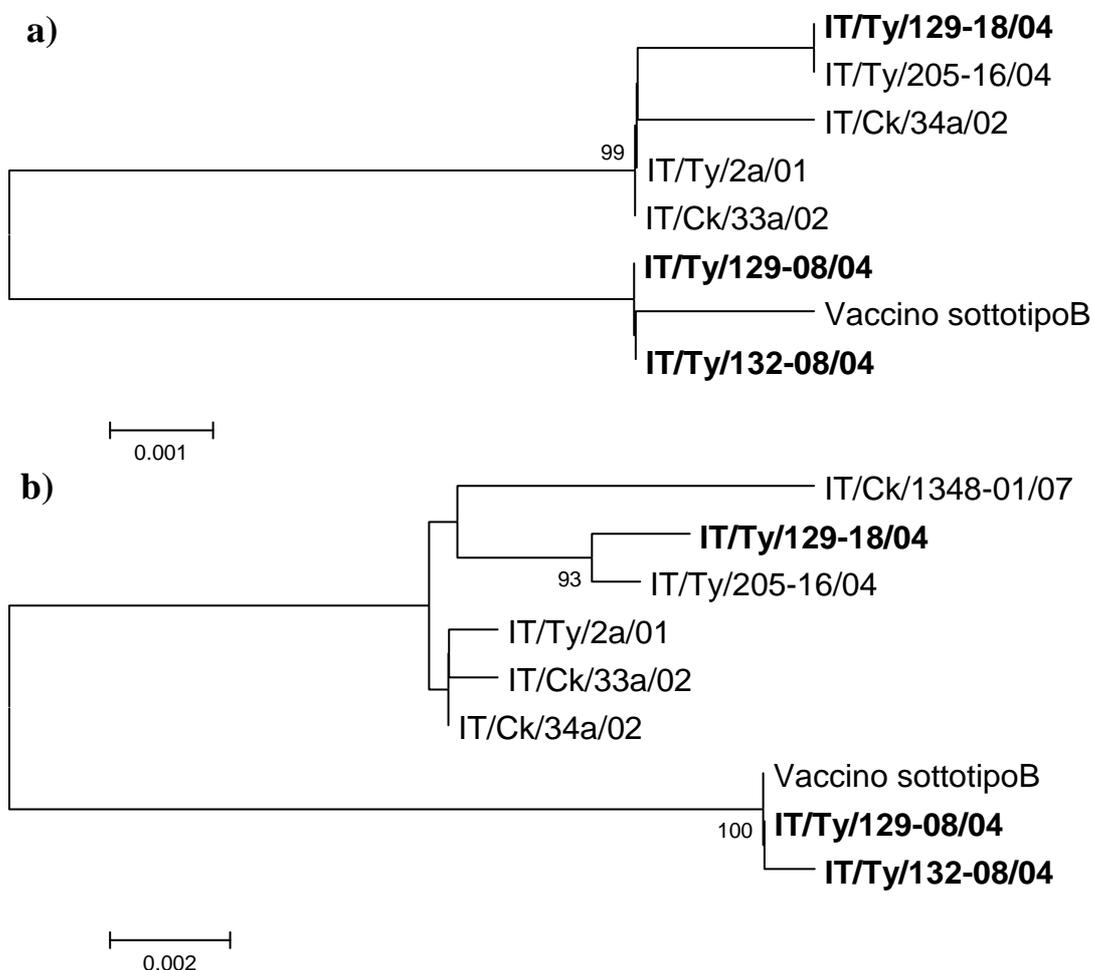


Figura A.5. Albero filogenetico delle sequenze di F (a) e G (b) di AMPV sottotipo B isolati negli studi longitudinali (in grassetto) paragonati al vaccino e a sequenze analoghe di ceppi di campo. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.

STUDIO B

EVOLUZIONE GENOMICA DI AMPV NEL PERIODO 1986-2007

B.1. INTRODUZIONE

I risultati degli studi longitudinali riportati nella prima parte della tesi hanno evidenziato come tacchini vaccinati per AMPV ad un giorno di vita si infettino tardivamente con virus di campo sviluppando forme cliniche. Ciò può essere imputato, oltre che a vaccinazione mal praticata o scarsa durata dell'immunità, ad elusione dell'immunità vaccinale conseguente ad evoluzione genomica del virus di campo.

Nel secondo studio è stata presa in considerazione questa ipotesi e sviluppata mediante analisi filogenetica di ceppi di AMPV sottotipo B isolati in Italia ed Europa nel periodo 1986-2007. Sono stati considerati 15 ceppi, nove Italiani e sei Europei, sequenziati nei geni codificanti per le proteine G ed F e paragonati fra loro e con analoghe sequenze presenti in *Genbank*. Quindi, allo scopo di identificare ulteriori regioni genomiche chiave per l'evoluzione di AMPV, due ceppi Italiani, del 1987 e del 2004, e il vaccino prevalentemente utilizzato in Italia, sono stati paragonati nell'intero genoma.

B.2. MATERIALI E METODI

B.2.1. Ceppi virali

Nella tabella B.1 sono riportati i ceppi virali presi in considerazione in questo studio e caratterizzati come sottotipo B mediante RT-nested PCR sottotipo specifica (paragrafo A.2.2.). Nove di questi sono stati isolati nel periodo 1986-1994 (ceppi pre 1994), i restanti, tutti italiani provenienti dal Veneto, nel periodo 2001-2007 (ceppi post 2000).

Tabella B.1. Ceppi AMPV sottotipo B caratterizzati

	Ceppo AMPV	Anno d'isolamento	Paese d'origine	Specie	Referenza
ceppi pre-1994	Vaccino sottotipo B [§]	1986	Francia	Tacchino	
	France 38/86	1986	Francia	Tacchino	Naylor <i>et al.</i> , 1998
	IT/Ty/Vr240/87 [§]	1987	Italia	Tacchino	Sperati Ruffoni L. (Laboratorio AIA)
	Neth 8726/90	1990	Olanda	Tacchino	Cook <i>et al.</i> , 1995
	Italy16/91	1991	Italia	Tacchino	Naylor C. J. (Università di Liverpool)
	Italy 2119	pre-1993	Italia	Tacchino	Collins <i>et al.</i> , 1993
	France 147	pre-1994	Francia	Tacchino	Naylor C. J. (Università di Liverpool)
	Spain 149	pre-1994	Francia	Tacchino	Naylor C. J. (Università di Liverpool)
	UK/8/94	1994	Regno Unito	Tacchino	Naylor <i>et al.</i> , 1994
	UK/11/94	1994	Regno Unito	Pollo	Cook <i>et al.</i> , 1995
ceppi post-2000	IT/Ty/2a/01	2001	Italia	Tacchino	Catelli <i>et al.</i> , 2004
	IT/Ck/33a/02	2002	Italia	Pollo	Catelli <i>et al.</i> , 2004
	IT/Ck/34a/02	2002	Italia	Pollo	Catelli <i>et al.</i> , 2004
	IT/Ty/129-18/04	2004	Italia	Tacchino	Catelli <i>et al.</i> , 2004
	IT/Ty/205-16/04 [§]	2004	Italia	Tacchino	Catelli <i>et al.</i> , 2004
	IT/Ck/1348-01/07*	2007	Italia	Pollo	Catelli E. (Università di Bologna)

* RNA estratto da tamponi a secco

§ Sequenziato nell'intero genoma

In generale tutti i virus avevano subito un numero limitato di passaggi su TOC (paragrafo A.2.3.), o altre colture cellulari. In un unico caso la caratterizzazione molecolare è stata eseguita da RNA estratto da tamponi a secco.

Un unico ceppo vaccinale sottotipo B, quello ampiamente utilizzato in Italia, è stato incluso nello studio.

B.2.2. Analisi di sequenza dei geni G ed F

Per ottenere le sequenze intere dei geni G ed F sono state eseguite, in maniera indipendente per ciascun gene, una RT e tre PCR *overlapping*. Le sequenze nucleotidiche dei *primers* utilizzati sono riportate in tabella B.2. I *primers* specifici per le regioni interne ai geni F e G di AMPV sottotipo B sono stati disegnati sulla base di sequenze già presenti in *Genbank*. I *primers* per le regioni geniche confinanti con i due geni sono state ottenute da sequenze parziali o dal paragone con sequenze di tratti analoghi di AMPV sottotipo A o *virus respiratorio sinciziale*.

Tabella B.2. Sequenza nucleotidica dei *primers* utilizzati nelle reazioni di RT-PCR per amplificare i geni F e G di AMPV.

	Nome e sequenza (5'-3') del <i>primer</i>	Gene	Posizione ^a	Dimensioni dell'amplificato (bp)
MB1+ ^b	GAGGACTAGGTATGTCCTGAAG	M	2852	726
F1-	CCTGCACTATCAGAGAATTG	F	3578	
F5+	CCTCGAAATAGGGAATGTTGAGAAC	F	3090	1031
F3-	CCTATGGAGCAACTTACAC	F	4121	
F7+	GACACCCTGTCAGTATGGATC	F	4043	643
M2:3-	CATGATCAGGCCAGGACCAATAATTAT	M2	4686	
SH1+ ^b	GCTTTGATCTTCCTTGTTGC	SH	5507	953
G6-	CTGACAAATTGGTCCTGATT	G	6460	
Gstart+	CAAGTATCCAGATGGGGTC	G	5914	1245
GB1-	GTACAGCACCCTCAATCAG	G	7159	
G15+	GACTGCACACTATCTGATCCAG	G	7000	926
Lb6-	CAGTTGCTAACCCAGACACAC	L	7926	

^a senso anti-genomico

^b utilizzato anche per la reazione di retrotrascrizione (RT)

B.2.2.a. Estrazione dell'RNA ed RT PCR

L'RNA è stato estratto dal terreno di coltura o dal vaccino risospeso utilizzando un kit del commercio (QIAamp viral miny Kit, Quiagen). L'RNA dai tamponi a secco è stato estratto come precedentemente riportato (A.2.3).

Retrotrascrizione (RT)

Per la reazione di retrotrascrizione dell'RNA a DNA veniva preparata una mix di reazione di volume finale di 20 µl costituita da: 1 µl di Improm-IITM Reverse Transcriptase (Promega), 20 u di RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega), 15 pmol del *primer*, 0,5 mM di dNTP (Promega), 4 µl di Improm-IITM 5X Reaction

Buffer (Promega), 3 mM di MgCl₂. A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (Mineral oil, Cat. N. M-8410, SIGMA®) e 4 µl dell'RNA risospeso. La reazione veniva ottenuta tramite incubazione a 42°C per 60 minuti e 94°C per 5 minuti.

PCR

Per ogni reazione di PCR dal volume finale di 50 µl veniva preparata la seguente mix: 10 pmol di *primer* senso; 10 pmol di *primer* antisenso; 10 µl 5X PCR GoTaq® Reaction Buffer (Promega); 1.25 u di GoTaq® DNA Polymerase (Promega); 1 µl di dNTP (Promega); 43 µl di acqua per biologia molecolare. A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 5 µl di prodotto della RT (cDNA). I cicli consistevano in: pre-denaturazione a 94°C per 5 minuti; 35 cicli di amplificazione caratterizzati da una fase di denaturazione (53°C per 30 sec), una di appaiamento (72°C per 100 sec) ed una di estensione (94° C per 30 sec). L'ultimo ciclo era seguito da un appaiamento addizionale (53°C, 2 min) e un'estensione finale (72°C, 7 min). I risultati della amplificazione erano visualizzati con corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% colorato con Bromuro di Etidio. Per evidenziare l'andamento della corsa, a 5 µl di campione è stato aggiunto 1 µl di blu di bromofenolo. La specificità del prodotto è stata valutata con l'uso di un *marker* di riferimento (ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen).

B.2.2.b. Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. I campioni purificati sono stati inviati al Centro BMR Genomics di Padova dove venivano sequenziati in entrambe le direzioni con il sequenziatore automatico 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA).

Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate, utilizzando Clustal W, a tutte le sequenze complete dei geni G ed F di AMPV sottotipo B già pubblicate in *Genbank*, (B.2.2.c). L'analisi filogenetica è stata realizzata utilizzando l'algoritmo *neighbour-joining* col software MEGA4. I valori di *bootstrap* erano ottenuti con 1000 replicati e sono stati considerati significativi solo quelli > 70, che corrispondono ad un intervalli di confidenza >95%.

B.2.2.c. Numeri di accesso (n.a.) alle sequenze nucleotidiche

Di seguito sono riportati i ceppi AMPV inclusi nell'analisi filogenetica.

Gene F

Hungary 657/4/89 (n.a. Y14290); Hungary/97 (n.a. Y14291); Italy/182/88 (n.a. Y14292); France/PR8602/86 (n.a. Y14293); UK/8/94 (n.a. Y14294);

Gene G:

Hungary 657/4/89 (n.a. L34033); Italy 2119 (n.a. L34031); Spain 872S (n.a. L34034); Israel 1708/02 (n.a. AY728268);

B.2.3. Analisi di sequenza del genoma completo di AMPV

Due ceppi AMPV isolati in Italia nel 1987 (IT/Ty/Vr240/87) e nel 2004 (IT/Ty/205-16/04) assieme al vaccino sottotipo B sono stati sequenziati nell'intero genoma presso il Department of Veterinary Pathology dell'Università di Liverpool (UK).

B.2.3.a. Estrazione dell'RNA ed RT PCR

L'intero genoma è stato amplificato seguendo la metodica descritta da Naylor *et al.*, (2004), schematicamente illustrata in figura B.1.

B.2.3.b. Sequenziamento ed analisi filogenetica

Le sequenze dei prodotti di PCR sono state elaborate e assemblate utilizzando il software Bioedit ed allineate fra loro con Clustal W. Il grado di differenza delle sequenze di ciascun gene dei ceppi IT/Ty/Vr240/87, IT/Ty/205-16/04 e vaccinale, sia a livello nucleotidico sia aminoacidico, è stato determinato con l'utilizzo di MEGALIGN Program (DNASTAR software package, Lasergene Inc., USA).

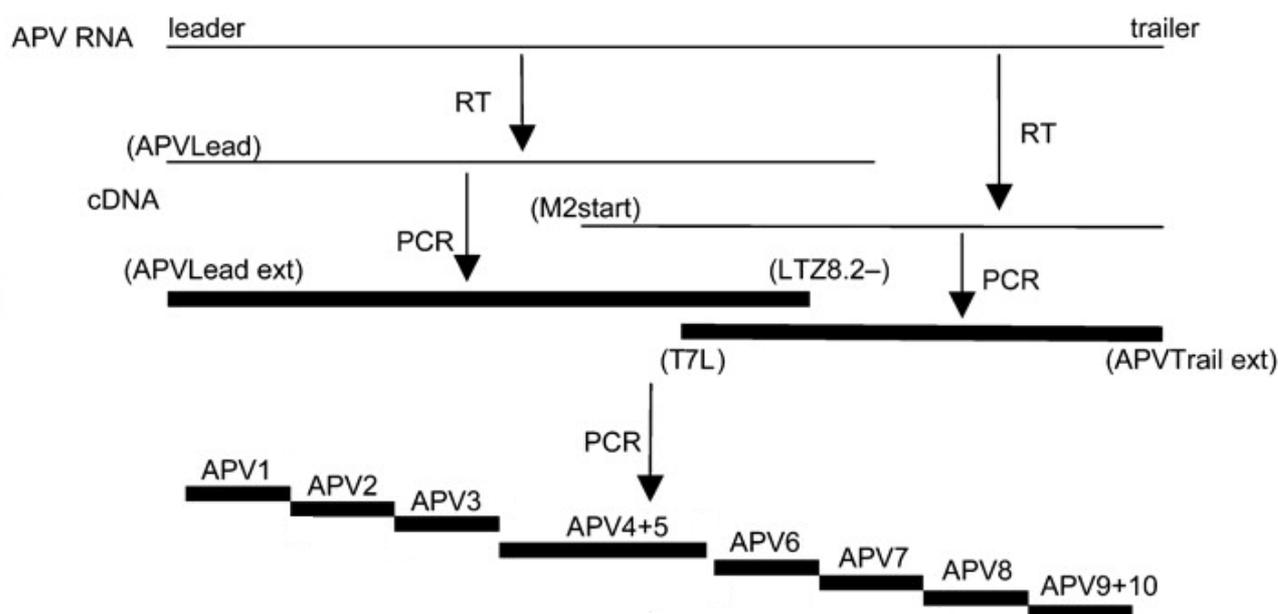


Figura B.1. Schema utilizzato per ottenere l'amplificazione dell'intero genoma di AMPV. Dall'RNA estratto, mediante due retro-trascrizioni, sono stati ottenute copie in DNA *overlapping*. Da queste sono state ottenuti due amplificati, utilizzati successivamente come template per 8 ulteriori reazioni di PCR. (Naylor *et al.*, 2004).

B.3. RISULTATI

Da tutti i campioni esaminati sono stati ottenuti prodotti di amplificazione delle dimensioni attese (figura B.2. per il gene F) fatta eccezione solo per il ceppo IT/1348-01/07, del quale è stato possibile amplificare solo il gene G.

Nell'analisi si è spesso preferito utilizzare le sequenze amminoacidiche predette rispetto alle nucleotidiche, poiché si è assunto che le prime fossero più strettamente correlate all'antigenicità della rispettiva proteine.

B.3.1. Analisi di sequenza del gene F

Il paragone fra le sequenze amminoacidiche dedotte della proteina F mostra come essa sia altamente conservata nel periodo di tempo considerato (figura B.3.). La media della percentuale d'identità amminoacidica fra il gruppo pre 1994 e il

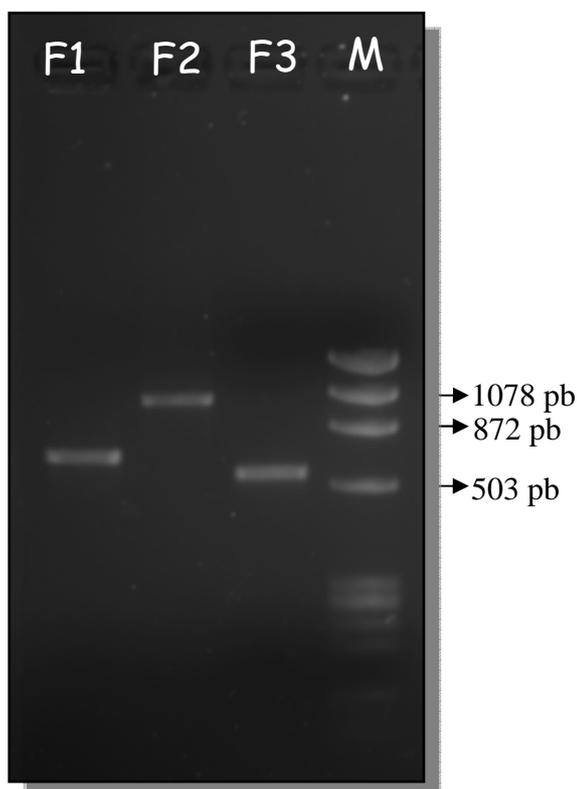


Figura B.2. Elettroforesi in gel di agarosio di amplificati da RT PCR per amplificare il gene F completo. DNA Marker (linea 4); prima (linea 1; 726 bp), seconda (linea 2; 1031 bp) e terza (linea 3; 643 bp) parte del gene F.

gruppo post-2000 è del 99.23%, non di molto inferiore a quella osservata all'interno del gruppo pre-1994 (99.41%) o all'interno del gruppo post-2000 (99.68%).

I ceppi italiani post-2000 mostrano solo due mutazioni codificanti persistenti negli anni (posizione aa 192 e 300) (figura B.3.).

L'albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche (figura B.4) mostra come i ceppi post-2000 formino un cluster nettamente separato (bootstrap=100) dai ceppi pre-1994, sia italiani che europei.

B.3.2. Analisi di sequenza del gene G

La proteina G mostra variazioni di gran lunga superiori a quelle osservate nella proteina F. La percentuale media d'identità fra le sequenze amminoacidiche predette della proteina G risulta infatti minore (tabella B.3.). La media della percentuale d'identità esistente fra i gruppi pre-1994 e post-2000 è 95.25%, minore rispetto all'identità osservata all'interno del gruppo pre-1994 (97.74%) o del gruppo post-2000 (99%).

Il paragone fra le sequenze amminoacidiche predette del gene G (figura B.5.) permette di osservare numerose mutazioni non sinonime, conservate negli anni, tutte riguardanti amminoacidi carichi (K, R, D, E e H) o amminoacidi potenzialmente glicosilabili nella fase post-traduzione, quali Serina (S) e Treonina (T). Nei ceppi italiani post-2000 queste modificazioni riguardano 6 amminoacidi carichi (aa 149, 173, 265, 273, 274 and 383) e 15 residui glicosilabili (aa 18, 92, 145, 151, 179, 193, 228, 237, 273, 276, 326, 329, 362, 365 and 387). La sequenza del ceppo israeliano rivela la presenza di 10 mutazioni amminoacidiche uniche, non presenti nei ceppi europei.

Il filogramma radiale (figura B.6.), analogamente a quanto già osservato nell'albero filogenetico del gene F, mostra due cluster, il primo formato dai virus pre-1994 e l'altro composto dagli AMPV italiani post-2000 (bootstrap = 100). Si può notare che gli isolati italiani pre-1994, nonostante formino un unico cluster con gli altri ceppi Europei dello stesso periodo, risultano geneticamente più vicini agli italiani post-2000. Questo è ben documentato anche dalla presenza esclusiva in tutti i ceppi Italiani del residuo Serina nella posizione 387 (figura B.5.). Un'ulteriore mutazione unica per i ceppi italiani è stata riscontrata al di fuori del gene G, nella porzione iniziale del gene che codifica per la polimerasi (L). Queste sequenze non sono state però incluse nell'analisi filogenetica.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120
France/PR8602/86 GASKMYLKLIIIYLVVGGASGKIQETYSBESCSTVTRGYKSVLRLTGWYTNVFNLEIGNVENITCNDGPSLISTELSLTQNALQELRTVVSADQITKENRILSHRKKRFVLGAIALGVATTA
France 147 .....
UK 8-94 .....
B Vaccine .....
Spain 149 .....
Hungary 657/4/89 .....
Hungary/97 .....
NL 6726/90 .....
IT/Ty/Vr240/87 .....
Italy/182/88 .....
Italy 16-91 .....
IT/Ty/2a/01 .....
IT/Ck/33a/02 .....
IT/Ck/34a/02 .....
IT/Ty/129-18/04 .....
IT/Ty/205-16/04 .....

      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
France/PR8602/86 AVTAGVALAKTIRLEGEVKAIKLALRSTNEAVSTLGNVRLILATAVNDLKEFISKKLTTPAINQNKCNIAIDIRMAISFGQNNRRFLNVVRQFSDSAGITSAVSLDMLTDAELVKAINRMP
France 147 .....
UK 8-94 .....
B Vaccine .....
Spain 149 .....
Hungary 657/4/89 .....
Hungary/97 .....
NL 6726/90 .....
IT/Ty/Vr240/87 .....
Italy/182/88 .....
Italy 16-91 .....
IT/Ty/2a/01 .....
IT/Ck/33a/02 .....
IT/Ck/34a/02 .....
IT/Ty/129-18/04 .....
IT/Ty/205-16/04 .....

      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
France/PR8602/86 SSGQISLMLNRRAMVRRKGFGLIGVYGGTVVYMQLPVIFGVIETPCWRVVAAPLCRHERESYACLLREDQGWYCTNAGSTAYYPNEDDCEVRDDYVFCDTAAGINVAEVEQCQNQIST
France 147 .....
UK 8-94 .....
B Vaccine .....
Spain 149 .....
Hungary 657/4/89 .....
Hungary/97 .....
NL 6726/90 .....
IT/Ty/Vr240/87 .....
Italy/182/88 .....
Italy 16-91 .....
IT/Ty/2a/01 .....
IT/Ck/33a/02 .....
IT/Ck/34a/02 .....
IT/Ty/129-18/04 .....
IT/Ty/205-16/04 .....

      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
France/PR8602/86 STYPCRVSTGRHPVSMVALTPLGGLVSCYEGVSCSIGSNKVGIIKQLNKGCTHIPNNEADTITIDNTIYQLSKVVGEGQRTIKGAPVNNFNPLLPEDQFNVALDQVFSVVKSKDLIDK
France 147 .....
UK 8-94 .....
B Vaccine .....
Spain 149 .....
Hungary 657/4/89 .....
Hungary/97 .....
NL 6726/90 .....
IT/Ty/Vr240/87 .....
Italy/182/88 .....
Italy 16-91 .....
IT/Ty/2a/01 .....
IT/Ck/33a/02 .....
IT/Ck/34a/02 .....
IT/Ty/129-18/04 .....
IT/Ty/205-16/04 .....

      490     500     510     520     530     540
France/PR8602/86 SNDLLDIEVKSNI GAALAITILAVLSMSIIVGIAYVVKRKAASNGYPKTTGQSNMGYIS*
France 147 .....
UK 8-94 .....
B Vaccine .....
Spain 149 .....
Hungary 657/4/89 .....
Hungary/97 .....
NL 6726/90 .....
IT/Ty/Vr240/87 .....
Italy/182/88 .....
Italy 16-91 .....
IT/Ty/2a/01 .....
IT/Ck/33a/02 .....
IT/Ck/34a/02 .....
IT/Ty/129-18/04 .....
IT/Ty/205-16/04 .....

```

Figura B.3.: Sequenza aminoacidica predetta della proteina F di ceppi AMPV europei collezionati fra il 1986 e il 2004. Per intero è mostrata la sequenza del ceppo più vecchio, France-PR8602/86, i residui delle altre sequenze sono specificati solo se differenti da questa.

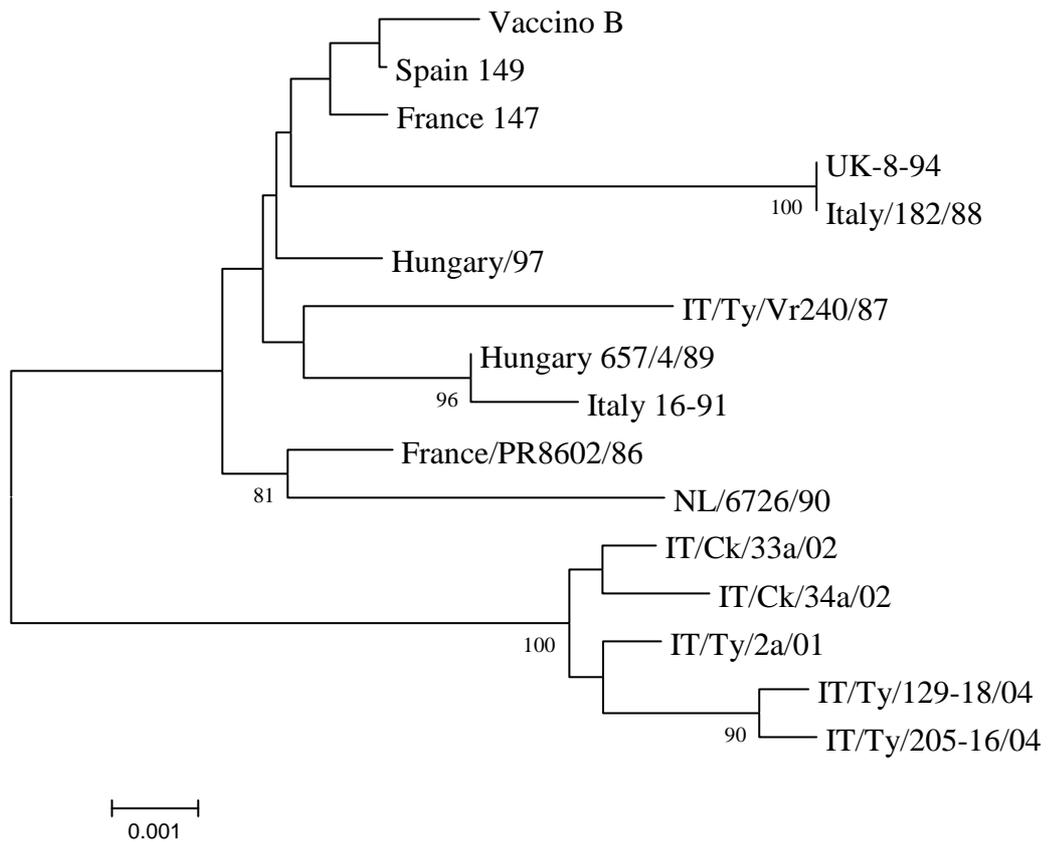


Figura B.4. Albero filogenetico di 16 ceppi di AMPV sottotipo B. L'albero è basato sulla sequenza nucleotidica del gene F, utilizzando MEGA4. Le lunghezze dei rami sono proporzionali alla differenza genetica stimata. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110     120
France 38/86  GTSIQMGSSELYIIIEGVSSSEIVLKVLRRSKILLGLVLSALGLTLTSTIVISICISVEQVKLRQCVDTYWAENGLHFGQSTENTSTRDKTTTKDPRRLQATGAGKPFESCGYVQVVDGD
NL/6726/90  .....R.....L.....
UK 8-94     .....Q.....
UK 11/94    .....T.....
Spain 872S  .....Q.....R.....G.....
B vaccine  .....R.....G.....
France 147  .....G.....
Spain 149   .....R.....G.....
Hungary 657/4/89 .....Q.....G.....
Israel 1708/02 ---X.....I.....
Italy 2119  .....Q.....
IT/Ty/Vr240/87 .....
Italy 16/91 .....
IT/Ty/2a/01 .....I.....
IT/Ck/33a/02 .....I.....
IT/Ck/34a/02 .....I.....
IT/Ty/129-18/04 .....I.....
IT/Ty/205-16/04 .....E.....I.....
IT/Ck/1348-01/07 .....P.....I.....

      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
France 38/86  MHDRSYAVLGGVDCLGLLALCESGPICGDITWSEDNFCRCTFSSHGVSCCKPNSKATTAQRNSKPANSKSTPPVHSDRASKEHNPSQGEQPRRGTSSKTTIASTPSTEDTAKPTISK
NL/6726/90  .....I.....
UK 8-94     .....G.....K.....G.....
UK 11/94    .....H.....G.....K.....E.....G.....
Spain 872S  .....L.....K.....
B vaccine  .....L.....K.....
France 147  .....K.....
Spain 149   .....K.....
Hungary 657/4/89 .....K.....
Israel 1708/02 .....R.....K.....K.....
Italy 2119  .....K.....K.....
IT/Ty/Vr240/87 .....K.....
Italy 16/91 .....K.....
IT/Ty/2a/01 .....S.....R.....A.....K.....I.....R.....M.....
IT/Ck/33a/02 .....S.....R.....A.....K.....I.....M.....
IT/Ck/34a/02 .....S.....R.....A.....K.....I.....M.....
IT/Ty/129-18/04 .....S.....R.....A.....E.....K.....I.....I.....M.....
IT/Ty/205-16/04 .....S.....R.....A.....E.....K.....I.....I.....M.....
IT/Ck/1348-01/07 .....S.....R.....A.....E.....K.....I.....I.....S.....M.....

      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
France 38/86  PKLTIKRSQGRGPGSTKKAASSTPSHKINTRGTSKTTDQRPRTGPTGPRQTHSTATPPPTPIHKGRAPTPKPTDLKVNPREGSTSPTAIQKNFTTQSNLVDCTLSDPDEPQRCYQV
NL/6726/90  .....N.....N.....
UK 8-94     .....K.....S.....E.....G.....P.....
UK 11/94    .....K.....S.....N.....E.....G.....P.....P.....
Spain 872S  .....E.....
B vaccine  .....E.....
France 147  .....E.....
Spain 149   .....E.....
Hungary 657/4/89 .....E.....
Israel 1708/02 .....K.....S.....D.....K.....V.....Q.....P.....G.....T.....
Italy 2119  .....
IT/Ty/Vr240/87 .....I.....
Italy 16/91 .....
IT/Ty/2a/01 .....Y.....RE.....I.....N.....
IT/Ck/33a/02 .....Y.....RE.....I.....L.....N.....
IT/Ck/34a/02 .....Y.....RE.....I.....N.....
IT/Ty/129-18/04 .....Y.....RE.....I.....N.....S.....
IT/Ty/205-16/04 .....Y.....RE.....I.....N.....S.....
IT/Ck/1348-01/07 .....Y.....RE.....I.....N.....

      370     380     390     400     410     420
France 38/86  GTYNPSQSGTGNIEVPCSTYGHACMATLYDTFFNCWRRTRRCICDSGGELIEWCCTSQ*
NL/6726/90  .....*
UK 8-94     .....*
UK 11/94    .....Y.....*
Spain 872S  .....*
B vaccine  .....*
France 147  .....*
Spain 149   .....*
Hungary 657/4/89 .....*
Israel 1708/02 .....L.....Y.....*
Italy 2119  .....S.....*
IT/Ty/Vr240/87 .....S.....*
Italy 16/91  .....S.....*
IT/Ty/2a/01 .....Y.....S.....*
IT/Ck/33a/02 .....Y.....S.....*
IT/Ck/34a/02 .....Y.....S.....*
IT/Ty/129-18/04 .....Y.....S.....*
IT/Ty/205-16/04 .....Y.....S.....*
IT/Ck/1348-01/07 .....A.....S.....Y.....S.....*

```

Figura B.5.: Sequenza aminoacidica predetta della proteina G di ceppi AMPV europei collezionati fra il 1986 e il 2007. Per intero è mostrata la sequenza del ceppo più vecchio, France-PR8602/86, i residui delle altre sequenze sono specificati solo se differenti da questa.

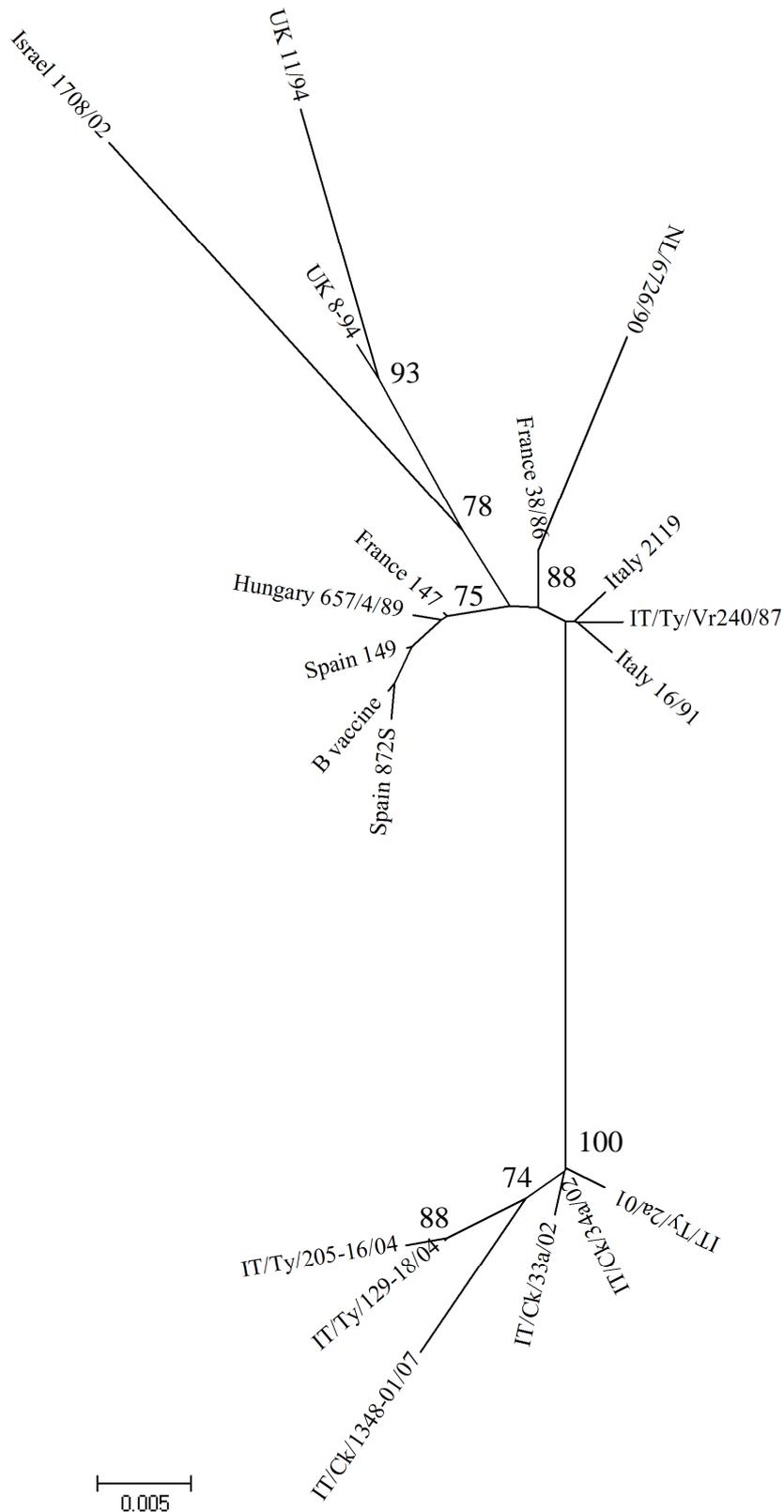


Figura B.6. Filogramma radiale di 19 ceppi di AMPV sottotipo B. Il filogramma è basato sulla sequenza aminoacidica predetta della proteina G, utilizzando MEGA4. Le lunghezze dei rami sono proporzionali alla differenza genetica stimata. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito. Sono riportati solo valori di bootstrap > 70.

Tabella B.3. Grado di identità fra le sequenze del gene G dei ceppi esaminati. Esso indica il numero di residui identici sulla lunghezza totale. Nella parte superiore della tabella è riportato il grado d'identità fra i nucleotidi, nella parte inferiore fra gli aminoacidi. Moltiplicando i valori per 100 si ottiene l'identità come percentuale.

CEPPO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1 UK 8-94		0,993	0,986	0,986	0,987	0,986	0,987	0,982	0,987	0,971	0,988	0,987	0,984	0,972	0,972	0,973	0,97	0,971	0,966
2 UK 11/94	0,983		0,979	0,981	0,983	0,981	0,981	0,977	0,982	0,968	0,982	0,982	0,979	0,969	0,969	0,97	0,966	0,967	0,963
3 Spain 872S	0,978	0,961		0,998	0,996	0,996	0,996	0,987	0,992	0,972	0,994	0,992	0,99	0,978	0,978	0,979	0,975	0,976	0,972
4 vaccino B	0,975	0,963	0,997		0,998	0,998	0,996	0,989	0,994	0,974	0,994	0,994	0,991	0,979	0,979	0,98	0,977	0,978	0,974
5 France 147	0,98	0,968	0,992	0,995		0,998	0,998	0,991	0,995	0,975	0,995	0,995	0,993	0,981	0,981	0,982	0,979	0,979	0,975
6 Spain 149	0,978	0,966	0,995	0,997	0,997		0,996	0,989	0,994	0,974	0,994	0,994	0,991	0,979	0,979	0,98	0,977	0,978	0,974
7 Hungary 657/4/89	0,983	0,966	0,995	0,992	0,997	0,995		0,989	0,994	0,974	0,995	0,994	0,991	0,979	0,979	0,98	0,977	0,978	0,974
8 NL/6726/90	0,966	0,954	0,973	0,975	0,98	0,978	0,978		0,995	0,971	0,991	0,991	0,989	0,977	0,977	0,978	0,975	0,975	0,971
9 France 38/86	0,978	0,966	0,985	0,987	0,992	0,99	0,99	0,987		0,975	0,996	0,996	0,994	0,982	0,982	0,983	0,979	0,98	0,976
10 Israel 1708/02	0,958	0,951	0,956	0,958	0,963	0,961	0,961	0,951	0,963		0,975	0,975	0,973	0,962	0,962	0,963	0,96	0,961	0,957
11 It 2119	0,98	0,963	0,987	0,985	0,99	0,987	0,992	0,98	0,992	0,961		0,998	0,995	0,983	0,983	0,984	0,981	0,982	0,978
12 IT/Ty/Vr240/87	0,975	0,963	0,983	0,985	0,99	0,987	0,987	0,98	0,992	0,961	0,995		0,995	0,983	0,983	0,984	0,981	0,982	0,978
13 Italy 16/91	0,975	0,963	0,983	0,985	0,99	0,987	0,987	0,98	0,992	0,961	0,995	0,995		0,981	0,981	0,982	0,979	0,979	0,975
14 IT/Ty/2a/01	0,949	0,944	0,954	0,956	0,961	0,958	0,958	0,951	0,963	0,939	0,966	0,966	0,966		0,998	0,999	0,994	0,995	0,992
15 IT/Ck/33a/02	0,949	0,942	0,954	0,956	0,961	0,958	0,958	0,951	0,963	0,939	0,966	0,966	0,966	0,995		0,999	0,994	0,995	0,992
16 IT/Ck/34a/02	0,951	0,944	0,956	0,958	0,963	0,961	0,961	0,954	0,966	0,942	0,968	0,968	0,968	0,997	0,997		0,995	0,995	0,993
17 IT/Ty/129-18/04	0,944	0,937	0,949	0,951	0,956	0,954	0,954	0,946	0,958	0,934	0,961	0,961	0,961	0,99	0,99	0,992		0,997	0,99
18 IT/Ty/205-16/04	0,942	0,934	0,949	0,951	0,954	0,954	0,951	0,944	0,956	0,932	0,958	0,958	0,958	0,987	0,987	0,99	0,997		0,991
19 IT/Ty/1348-01/07	0,939	0,932	0,944	0,946	0,951	0,949	0,949	0,942	0,954	0,929	0,956	0,956	0,956	0,985	0,985	0,987	0,985	0,983	

B.3.3. Analisi di sequenza del genoma completo

Le percentuali di identità e differenza fra tutti i gene dei ceppi AMPV sequenziati, sia a livello nucleotidico che amminoacido, sono riportate numericamente e graficamente nella tabella B.4 e nella figura B7. Le proteine P, N, M, M2, M2-2, F ed L mostrano un alto grado d'identità fra i ceppi, all'incirca del 99%. Le sequenze che risultano più variabili sono quelle delle proteine G ed SH. In particolare le percentuali di differenza fra i geni SH e G del vaccino e dell'isolato italiano IT/Ty/205-16/04 sono molto maggiori di quelle osservate fra il vaccino ed il ceppo IT/Ty/240Vr/87.

Osservando la sequenza amminoacidica della proteina SH (figura B.8.) del ceppo del 2004 si notano 9 mutazioni rispetto al vaccino, solo tre delle quali sono condivise col ceppo del 1987. Le mutazioni riscontrate unicamente nel ceppo del 2004 coinvolgono due amminoacidi carichi (posizioni aa 27, 114) e quattro amminoacidi potenzialmente glicosilabili (posizioni aa 84, 99, 157, 175).

Tabella B.4. Grado di identità fra le sequenze nei singoli geni del vaccino e dei ceppi IT/Ty/Vr240/87 e IT/Ty/205-16/04. Nella parte superiore della tabella, per ogni gene, è riportato il grado d'identità fra i nucleotidi, nella parte inferiore fra gli aminoacidi. Moltiplicando i valori per 100 si ottiene l'identità come percentuale.

Gene N	1	2	3
1 Vaccino		0,991	0,996
2 IT/Ty/Vr240/87	0,997		0,989
3 IT/Ty/205-16/04	0,997	1	
Gene P	1	2	3
1 Vaccino		0,996	0,983
2 IT/Ty/Vr240/87	1		0,984
3 IT/Ty/205-16/04	0,996	0,996	
Gene M	1	2	3
1 Vaccino		0,99	0,994
2 IT/Ty/Vr240/87	0,996		0,993
3 IT/Ty/205-16/04	0,992	0,996	
Gene F	1	2	3
1 Vaccino		0,985	0,993
2 IT/Ty/Vr240/87	0,992		0,984
3 IT/Ty/205-16/04	0,992	0,992	
Gene M2	1	2	3
1 Vaccino		0,996	0,985
2 IT/Ty/Vr240/87	1		0,985
3 IT/Ty/205-16/04	0,994	0,994	
Gene M2-2	1	2	3
1 Vaccino		0,988	0,981
2 IT/Ty/Vr240/87	1		0,981
3 IT/Ty/205-16/04	0,986	0,986	
Gene SH	1	2	3
1 Vaccino		0,992	0,975
2 IT/Ty/Vr240/87	0,982		0,982
3 IT/Ty/205-16/04	0,948	0,965	
Gene G	1	2	3
1 Vaccino		0,995	0,979
2 IT/Ty/Vr240/87	0,987		0,982
3 IT/Ty/205-16/04	0,954	0,958	
Gene L	1	2	3
1 Vaccino		0,997	0,984
2 IT/Ty/Vr240/87	0,996		0,985
3 IT/Ty/205-16/04	0,991	0,993	

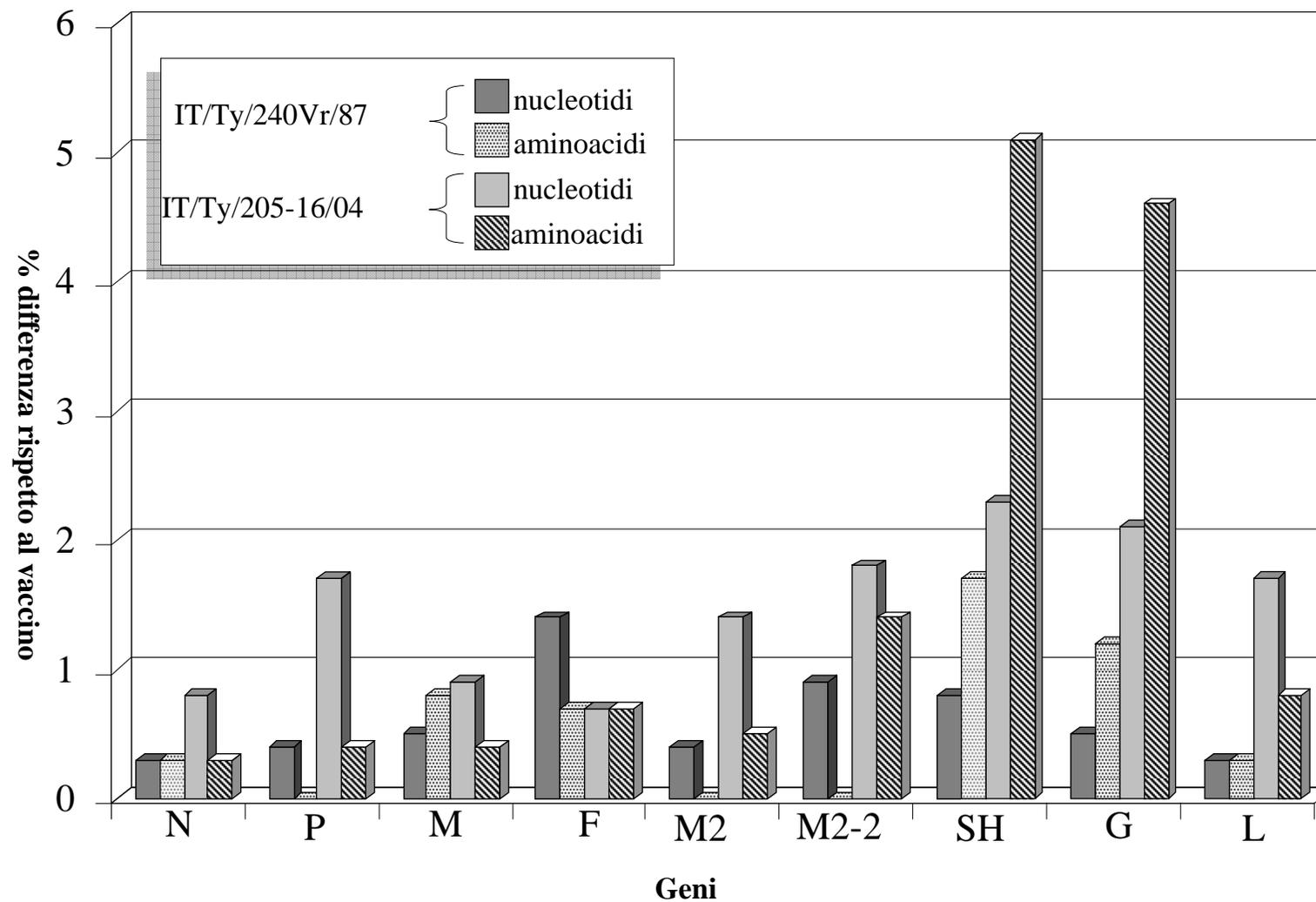


Figura B.7. Differenze (%) fra le sequenze, sia nucleotidiche che aminoacidiche, dei singoli geni dei ceppi IT/Ty/205-15/04 e IT/Ty/Vr240/87, rispetto al vaccino.

	10	20	30	40	50	60	70	
Vaccino	MTSTVNLGSSTSSRWTIAKSQCMLCLRTMMNCAVVICAVLVLIIFLVATIGLSVKLAVTIKERNTCQLRLS						
IT/Ty/Vr240/87							
IT/Ty/205-16/04							
	80	90	100	110	120	130	140	
Vaccino	ELSTTTAPILRSTNQPYLGGSTSTPKLTTVTSITDLTHQCPQRKELCNGTITYINSDGCLDE*EGESIDC						
IT/Ty/Vr240/87							
IT/Ty/205-16/04							
	150	160	170					
Vaccino	IELVARCVETLCDPNPNYNHCMCTKNSTGLWCCYN						
IT/Ty/Vr240/87	...I.....							
IT/Ty/205-16/04	...I.....							

Figura B.8. Sequenza aminoacidica dedotta della proteina SH del vaccino sottotipo B e dei ceppi AMPV IT/Ty/Vr240/87 e IT/Ty/205-16/04. Per intero è mostrata la sequenza del vaccino; i residui, per le altre sequenze, sono specificati solo se differenti.

PARTE C

ELUSIONE DELLA PROTEZIONE VACCINALE

C.1. INTRODUZIONE

L'analisi delle sequenze parziali e totali di AMPV, svolte nello studio precedente, ha permesso di distinguere nettamente i ceppo italiani post-2000 dal ceppo vaccinale e da tutti gli isolati pre-1994. Allo scopo di determinare se all'evoluzione genomica di AMPV osservata dopo il 2000, in particolare a livello di geni G ed SH, siano associate mutazioni antigeniche sufficienti al virus per eludere l'immunità vaccinale è stata eseguita un'infezione sperimentale in tacchini vaccinati inoculandoli con il ceppo IT/Ty/Vr240/87 o con il ceppo IT/Ty/205-16/04, sequenziati nell'intero genoma nello studio precedente, valutando la protezione mediante misurazione della sintomatologia clinica e della eliminazione virale.

C.2. MATERIALI E METODI

C.2.1. Vaccino AMPV

I tacchinotti sono stati vaccinati con un vaccino vivo attenuato sottotipo B del commercio, somministrato per via oculare alla dose consigliata dalla ditta produttrice. Il ceppo vaccinale è stato sequenziato nel genoma completo nello studio B.

C.2.2. Ceppi virali

Per il challenge sono stati utilizzati i ceppi AMPV sottotipo B IT/Ty/Vr240/87 e IT/Ty/205-16/04 isolati in Italia rispettivamente nel 1987 e nel 2004 e sequenziati per intero nello studio B. I virus, titolati seguendo il metodo di Reed e Muench (1938), sono stati somministrati quale surnatante colturale alla dose di $3.6 \log_{10} \text{CD}_{50}/\text{soggetto}$.

C.2.3. Tacchini

Sono stati utilizzati tacchini commerciali di un giorno di vita, non vaccinati per AMPV, provenienti da un incubatoio che applica misure di biosicurezza elevate.

C.2.4. Piano sperimentale



Figura C.1. Isolatori per pollame

La prova è stata eseguita in isolatori per pollame (figura C.1.) ed ha avuto la durata complessiva di 34 giorni. Tutti gli animali sono stati identificati con anello numerato al piede e introdotti in 3 differenti isolatori in numero di: 20 nell'isolatore A, 20 nell'isolatore B e 10 nell'isolatore C (controllo negativo). Ad un giorno di vita i tacchini dell'isolatore A sono stati vaccinati mentre gli altri (isolatori B e C) sono stati inoculati con acqua sterile (figura C.2.). A 21 giorni di vita, metà dei tacchini vaccinati

(gruppo V/CN) e metà dei tacchini non vaccinati (gruppo--/CN) sono stati collocati nello stesso isolatore ed infettati con il ceppo IT/Ty/205-16/04. I restanti animali vaccinati (gruppo V/CV) e non vaccinati (gruppo --/CV) sono stati anch'essi posti in un unico isolatore quindi infettati con il virus IT/Ty/Vr240/87. I controlli sono stati inoculati con acqua sterile (gruppo --/--). Per la vaccinazione e il challenge è stato inoculato un volume 100 µl. I controlli hanno



Figura C.2. Somministrazione per via oculare del vaccino al primo giorno di vita.

ricevuto la stessa quantità di acqua sterile. Nei giorni post infezione (p.i.), sino al 12°, in tutti i soggetti è stata valutata quotidianamente la sintomatologia clinica, come descritto nel paragrafo successivo. Ai giorni 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11 p.i sono stati eseguiti tamponi oro-faringei per valutare l'eliminazione virale mediante RT nested-PCR. Al 13° giorno p.i. tutti gli animali sono stati soppressi mediante dislocazione delle vertebre cervicali e smaltiti mediante incenerimento.

C.2.5. Misurazione della sintomatologia clinica

La sintomatologia clinica è stata misurata seguendo il metodo descritto da Naylor e Jones (1994), assegnando un punteggio ad ogni animale secondo la seguente scala:

- 0 nessun sintomo;
- 1 scolo nasale limpido;
- 2 scolo nasale torbido;
- 3 rigonfiamento dei seni infraorbitali e/o essudato schiumoso oculare.

Ciascun soggetto veniva dapprima osservato per evidenziare essudato schiumoso oculare o/e rigonfiamento dei seni infraorbitali; successivamente veniva eseguita una lieve pressione del seno infraorbitale per facilitare l'emissione dell'essudato nasale.

I soggetti che hanno mostrato punteggi \geq a 2 sono stati considerati affetti da sintomatologia grave.

C.2.6. RT nested-PCR per AMPV

I tamponi prelevati durante la prova sono stati processati individualmente e ciascuno immerso in 0.5 ml di *solution D*. L'estrazione dell'RNA e la RT nested-PCR sono state eseguite come descritto nel paragrafo A.2.3..

C.2.7. Analisi statistica

La normalità della distribuzione campionaria dei gruppi per la sintomatologia clinica è stata valutata mediante test di Kolmogorov-Smirnov. I valori presentavano una differenza statisticamente significativa ($p = 0.000$) con una distribuzione normale e, pertanto, tutte le successive valutazioni sono state condotte mediante test non parametrici. E' stato condotta preliminarmente una valutazione della differenza dei punteggi complessivamente registrati nei tre gruppi utilizzando il test di Kruskal-Wallis. I successivi confronti tra i gruppi sono stati condotti utilizzando il test U di Mann Whitney. Con p -value <0.05 la differenza veniva considerata statisticamente significativa. Il paragone fra i gruppi per quanto riguarda la % di malattia grave e l'eliminazione virale è stato condotto mediante il test Pearson *chi-square*, considerando la differenza significativa se p -value <0.05 .

C.3. RISULTATI

I punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti sono riportati nelle tabelle C.1., C.2., C.3., C.4. e gli andamenti delle medie giornaliere di ogni gruppo sono riassunti graficamente nella figure C.3 e C.4.

C.3.1. Sintomatologia clinica

Il gruppo di controllo non vaccinato e non infettato, per tutta la durata della prova, non ha mostrato sintomatologia clinica.

Nei gruppi non vaccinati ed infettati o col ceppo IT/Ty/240Vr/87 (--/CV) (tabella C.1.) o col ceppo IT/Ty/205-16/04 (--/CN) (tabella C.2.), la sintomatologia è comparsa fra il primo e il 4 giorno p.i. in pochi soggetti per poi, dal 5° giorno p.i., interessare tutti gli animali. Il massimo punteggio medio della sintomatologia clinica si è registrato al 6° giorno p.i. Alcuni soggetti hanno mostrato, per periodi di 2 o 3 giorni, rigonfiamento dei seni infraorbitali (Figura C.5.) ed essudato schiumoso a livello oculare. L'andamento delle medie giornaliere dei gruppi non vaccinati sono riportati graficamente nella figura C.3. Il punteggio medio cumulativo nel periodo di osservazione è stato pari a 12,9 nel gruppo --/CV ed a 15,2 nel gruppo --/CN.

Tabella C.1. Gruppo --/CV: non vaccinato ed inoculato con IT/Ty/240Vr/87. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

Soggetto	Giorni post-infezione											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0*	0	0	2	3	2	2	1	0	1	0	0
2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	0
3	0	0	2	2	3	3	3	1	3	1	0	0
4	0	0	0	1	2	2	2	1	0	0	0	0
5	0	0	0	1	2	2	2	2	0	1	0	0
6	0	0	0	2	3	2	2	2	1	0	1	0
7	0	0	0	2	2	3	2	2	0	2	1	0
8	0	0	3	3	3	3	3	3	1	1	0	0
9	0	0	0	0	2	3	2	3	0	1	0	0
10	0	0	0	2	2	2	2	2	1	1	0	0
Media giornaliera	0	0	0,5	1,7	2,4	2,4	2,2	1,9	0,8	0,8	0,2	0

Tabella C.2. Gruppo --/CN: non vaccinato ed inoculato con IT/Ty/205-16/04. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

Soggetto	Giorni post-infezione											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0*	0	3	2	2	3	3	2	2	0	1	0
2	0	0	0	0	2	3	2	2	1	0	1	0
3	0	0	0	3	2	3	3	2	0	0	0	0
4	0	0	0	1	3	3	2	2	1	0	0	0
5	1	1	2	3	3	3	3	3	3	0	0	0
6	0	0	3	3	2	2	2	2	1	1	0	0
7	0	0	1	2	3	3	2	2	2	0	0	0
8	0	0	2	2	3	3	2	2	2	0	0	0
9	0	0	0	3	2	3	2	2	2	0	0	0
10	1	0	3	2	2	3	2	2	0	0	0	0
Media giornaliera	0,2	0,1	1,4	2,1	2,4	2,9	2,3	2,1	1,4	0,1	0,2	0

* punteggio assegnato alla sintomatologia clinica di ciascun soggetto.

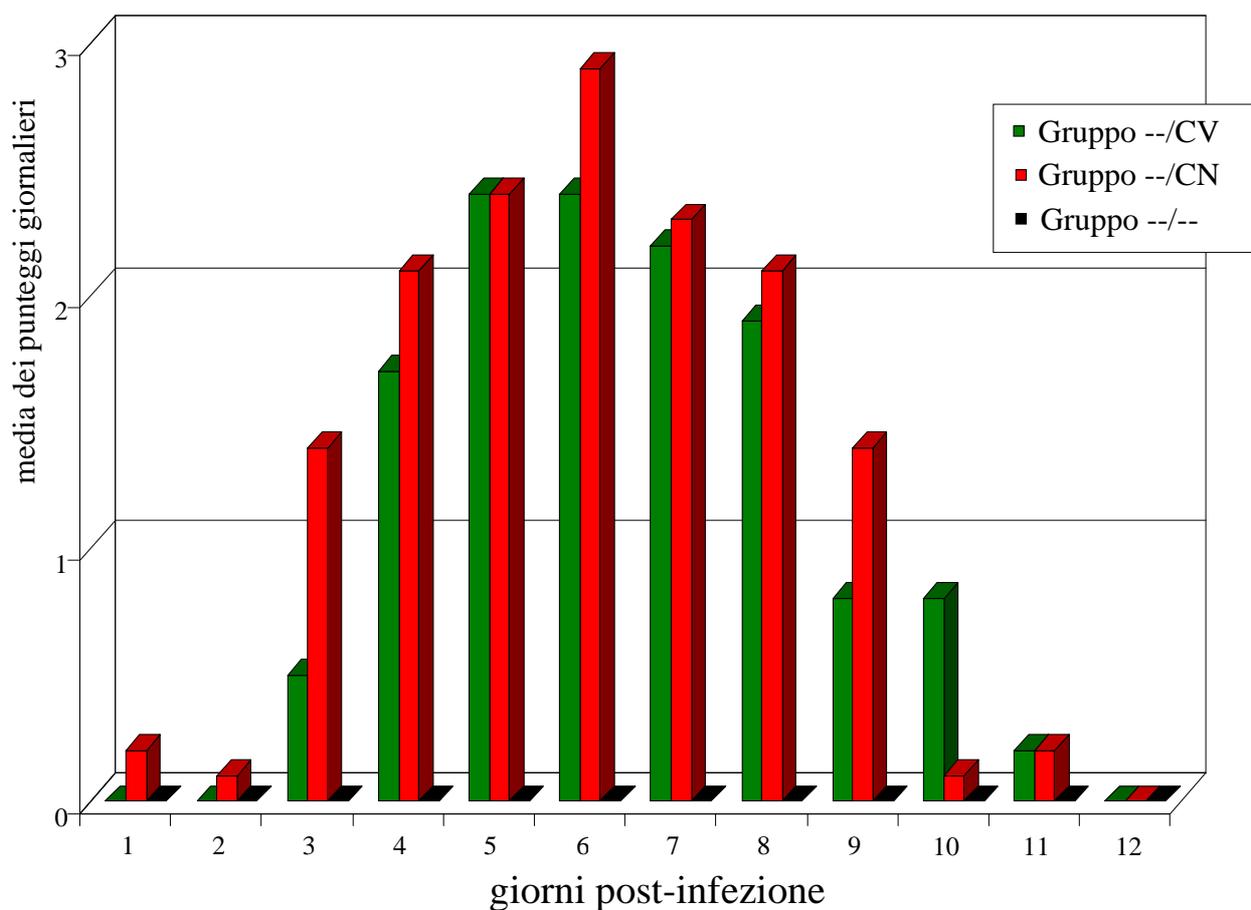


Figura C.3. Media delle osservazioni cliniche giornaliere dei gruppi non vaccinati ed infettati con IT/Ty/240Vr/87 (gruppo --/CV) o IT/Ty/205-16/04 (gruppo --/CN) e dei controlli (gruppo --/--).

Nei gruppi vaccinati ed infettati con il ceppo IT/Ty/Vr240/87 (V/CV) la sintomatologia è risultata lieve (tabella C.3.), con massimo punteggio al 7° giorno quando 4 animali hanno mostrato essudato nasale limpido (punteggio 1); un solo animale ha mostrato sintomatologia grave (punteggio 2) e solo al 10° giorno p.i. Il punteggio medio cumulativo durante il periodo di osservazione è stato pari a 0,8.

Tabella C.3. Gruppo V/CV: vaccinato ed inoculato con IT/Ty/Vr240/87. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

Soggetto	Giorni post-infezione											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Media giornaliera	0	0	0	0,1	0	0,1	0,4	0	0	0,2	0	0

* punteggio assegnato alla sintomatologia clinica di ciascun soggetto.

Il gruppo vaccinato e sottoposto a challenge con IT/Ty/205-16/04 (V/CN) ha mostrato sintomatologia più grave (tabella C.4.) rispetto al gruppo V/CV. Già al 3° giorno p.i. due animali hanno mostrato sintomatologia grave con essudato nasale torbido (punteggio 2) ed il picco di tale sintomatologia si è avuto al 7° giorno post infezione quando 4 animali hanno avuto punteggio 2. Il punteggio medio cumulativo durante il periodo di osservazione è stato pari a 3,4.

Il confronto degli andamenti delle medie giornaliere dei gruppi vaccinati sono riportati nella figura C.4.

Tabella C.4. Gruppo V/CN: vaccinato ed inoculato con IT/Ty/205-16/04. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

Soggetto	Giorni post-infezione											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0*	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0
3	1	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0
4	0	0	2	1	0	2	1	2	0	0	1	0
5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0
9	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Media giornaliera	0,1	0	0,4	0,1	0	0,7	1,1	0,5	0,3	0	0,2	0

* punteggio assegnato alla sintomatologia clinica di ciascun soggetto.

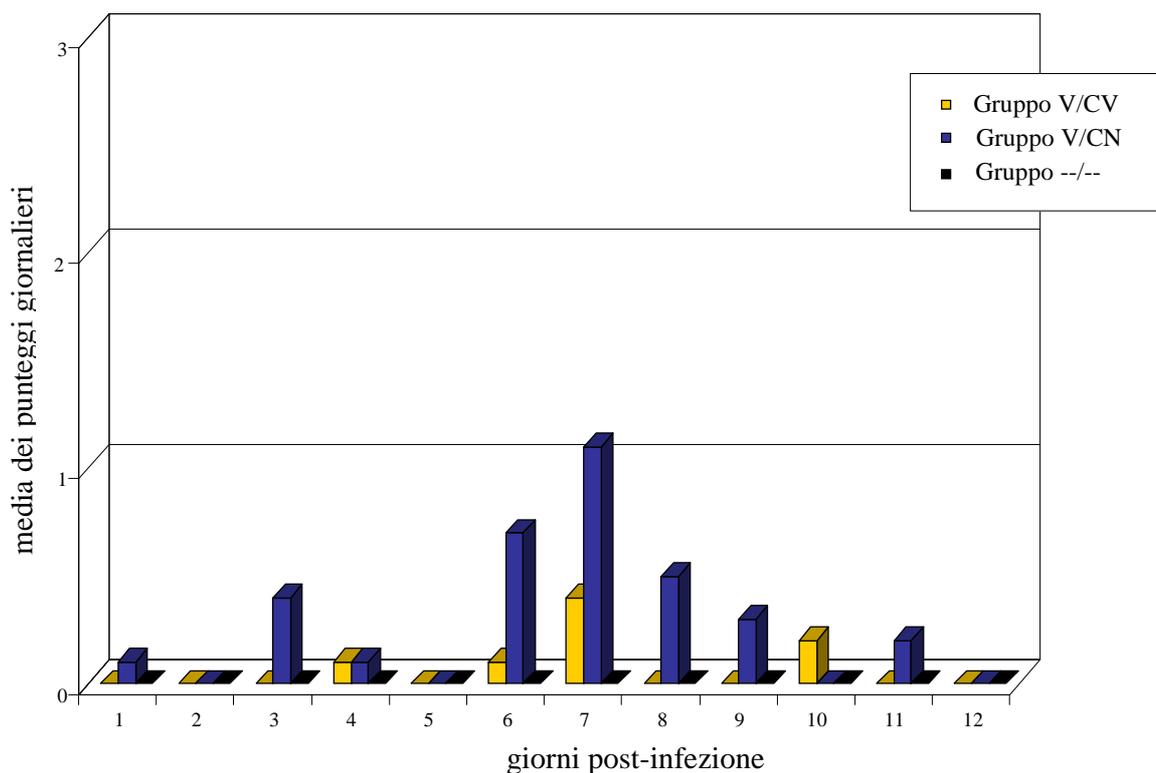


Figura C.4. Media delle osservazioni cliniche giornaliere dei gruppi vaccinati ed infettati con IT/Ty/240Vr/87 (gruppo V/CV) o IT/Ty/205-16/04 (gruppo V/CN) e dei controlli (gruppo --/--)

La percentuale di animali che almeno un giorno durante la prova ha mostrato sintomatologia grave (punteggio ≥ 2) è riportata in figura C.5. Come previsto tutti gli animali non vaccinati, per almeno un giorno durante la prova, hanno mostrato sintomatologia grave con rigonfiamento dei seni infraorbitali (figura C.6.) ed essudato schiumoso oculare. Anche il 50% degli animali del gruppo V/CN ha mostrato questo livello di sintomatologia, che invece non è stato mai osservato negli animale nel gruppo V/CO, indicando un alto livello di protezione del vaccino al challenge con il ceppo del 1987.

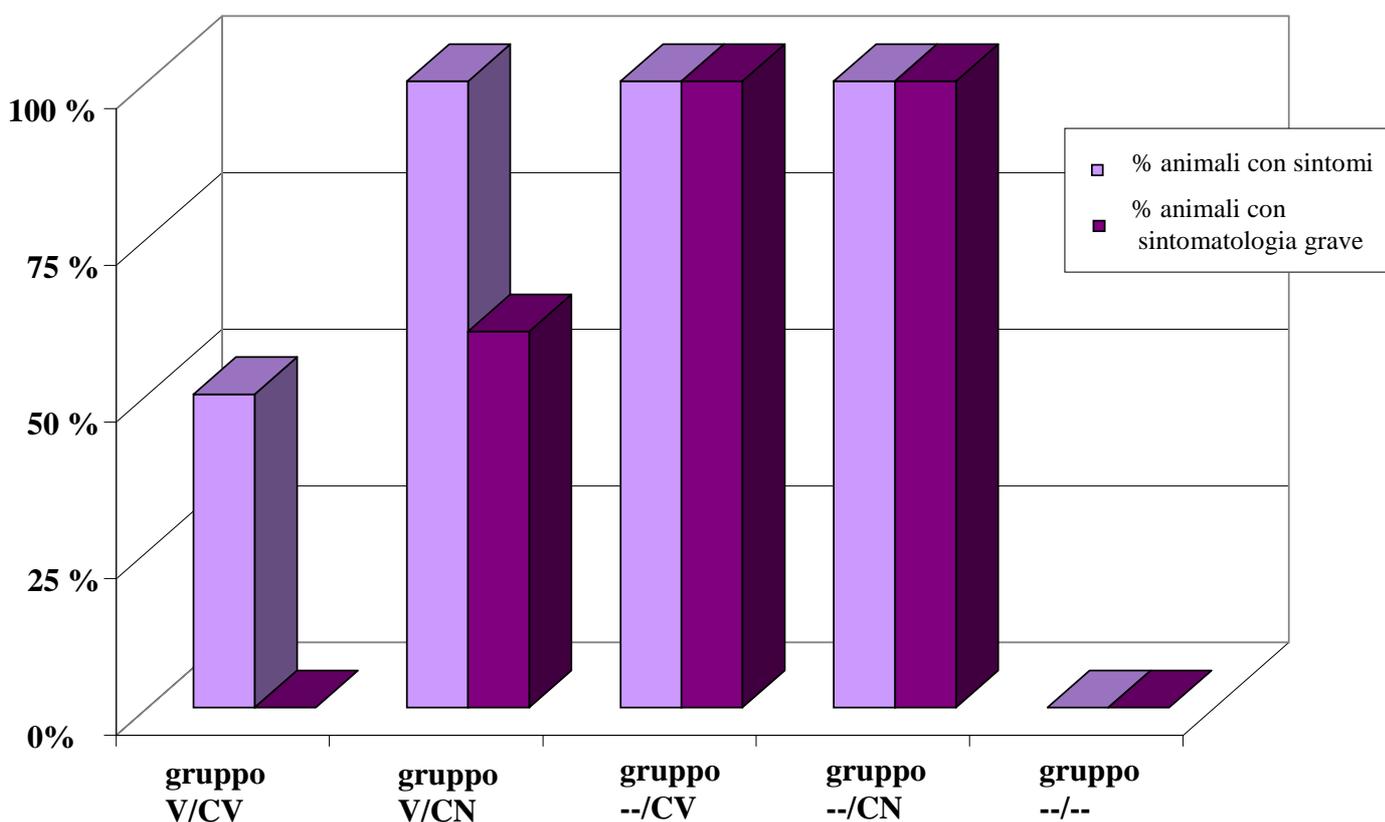


Figura C.5. Percentuale di animali che hanno mostrato sintomatologia (score ≥ 1) o sintomatologia grave (score ≥ 2) in ciascun gruppo sperimentale, per almeno un giorno nel corso della prova.

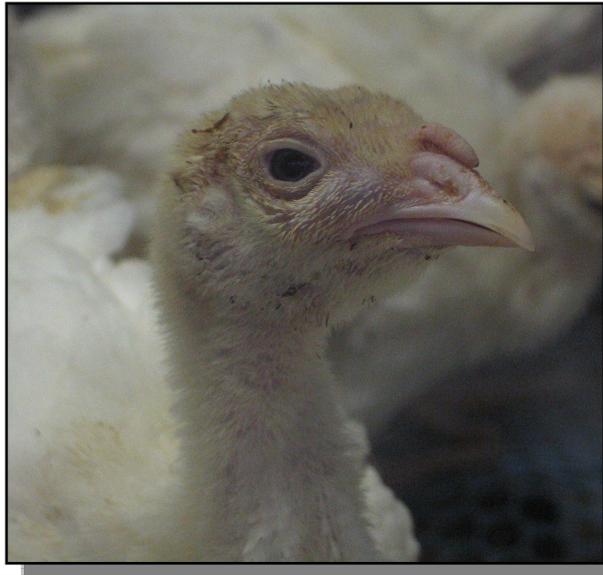


Figura C.6. Soggetti con evidente rigonfiamento del seno infraorbitale destro (punteggio 3).

C.3.2. Eliminazione virale post-challenge

I risultati dell'eliminazione virale di AMPV nei gruppi sperimentali sono riportati in tabella C.5. L'eliminazione nei gruppi vaccinati è riportata anche graficamente in figura C.7. Il gruppo di controllo (--/--) è risultato sempre negativo.

Tutti gli animali non vaccinati hanno eliminato a partire dal 3° giorno p.i. ed il grado di eliminazione si è mantenuto alto fino al sesto giorno p.i.

Nei gruppi vaccinati il numero complessivo di animali positivi per AMPV è stato più alto nel gruppo sottoposto a challenge con virus del 2004 (V/CN), rispetto al gruppo infettato col ceppo del 1987 (V/CV). Nei giorni 3, 4, 6 e 9 p.i., il doppio degli animali del gruppo V/CN ha eliminato rispetto al gruppo V/CV. L'eliminazione nel gruppo V/CN è inoltre più prolungata nel tempo.

Tabella C.5. Eliminazione AMPV post-infezione

Giorni post-infezione	Numero di campioni positivi ad AMPV su 10 esaminati				
	Gp. V/CV	Gp. V/CN	Gp. --/CO	Gp. --/CN	Gp. --/--
3	1	4	10	10	0
4	2	5	10	10	0
5	5	4	9	9	0
6	4	9	10	7	0
7	6	5	2	4	0
8	3	2	0	0	0
9	0	1	4	4	0
11	0	0	0	0	0
TOTALE	21	30	45	44	0

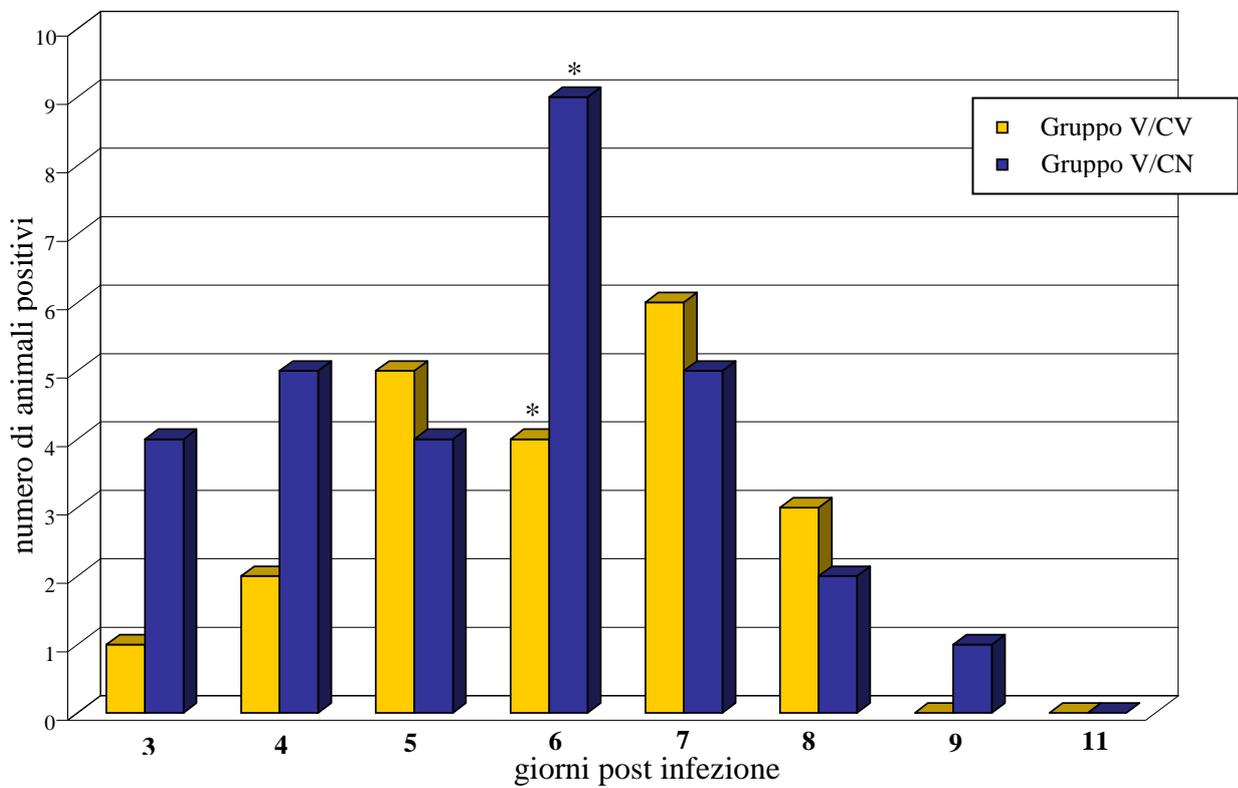


Figura C7. Eliminazione virale post infezione.
 (*) indica che la differenza fra i due gruppi è statisticamente significativa.

C.3.3. Valutazione statistica della sintomatologia clinica e della eliminazione virale

- Sintomatologia clinica

Il confronto tra il valore del punteggio della sintomatologia clinica fra i due gruppi non vaccinati ed infettati (--/CN; --/CV) non ha messo in evidenza una differenza statisticamente significativa (tabella C.6.; $p=0,227$). Mentre fra i gruppi vaccinati ed infettati con due diversi virus (V/CV; V/CN) la differenza è risultata statisticamente significativa (tabella C.7.; $p=0,001$). Tutti i gruppi hanno mostrato differenze significative dal gruppo controllo (--/--) (tabelle C.10., C.11.).

Tabella C.6. Confronto tra il gruppo --/CV e il gruppo --/CN

GRUPPO	Numerosità	Rango medio	Somma dei ranghi	Media punteggi
--/CV	120	115,40	13848,00	1,08
--/CN	120	125,60	15072,00	1,26
Totale	240			

U di Mann-Whitney = 6588,000 ; $p = 0,227$

Tabella C.7. Confronto tra il gruppo V/CV e il gruppo V/CN

GRUPPO	Numerosità	Rango medio	Somma dei ranghi	Media punteggi
V/CV	120	111,44	13361,00	0,063
V/CN	120	129,66	15559,00	0,28
Totale	240			

U di Mann-Whitney = 6101; $p = 0,001$

Tabella C.8. Confronto tra il gruppo --/CV e il gruppo V/CV

GRUPPO	Numerosità	Rango medio	Somma dei ranghi	Media punteggi
--/CV	120	150,72	18086,50	1,08
V/CV	120	90,28	10833,50	0,063
Totale	240			

U di Mann-Whitney = 3573,5; $p = 0,000$

Tabella C.9. Confronto tra il gruppo --/CN e il gruppo V/CN

GRUPPO	Numerosità	Rango medio	Somma dei ranghi	Media punteggi
--/CN	120	146,89	17627,00	1,26
V/CN	120	94,11	11293,00	0,28
Totale	240			

U di Mann- Whitney = 4033; p = 0,000

Tabella C.10. Confronto tra il gruppo V/CV e il gruppo --/--

GRUPPO	Numerosità	Rango medio	Somma dei ranghi	Media punteggi
V/CV	120	124,00	14880,00	0,063
--/--	120	117,00	14040,00	0,00
Totale	240			

U di Mann- Whitney = 6780; p = 0,007

Tabella C.11. Confronto tra il gruppo V/CN e il gruppo --/--

GRUPPO	Numerosità	Rango medio	Somma dei ranghi	Media punteggi
V/CN	120	133,00	15950,00	0,28
--/--	120	108,00	12950,00	0,00
Totale	240			

U di Mann- Whitney = 5700; p = 0,000

Sintomatologia clinica grave

I gruppi non vaccinati e sottoposti a challenge (--/CO e --/CN) non hanno mostrato fra di loro differenza significativa nel numero di soggetti che hanno mostrato sintomatologia clinica grave ($p=0.2425$) (tabella C.12.), e nemmeno fra loro i gruppi V/CV ed il controllo negativo (--/--) ($p=0.3163$) (tabella C.13.). Mentre la differenza era significativa fra il gruppo vaccinato e sottoposto a challenge con virus del 2004 (V/CN) ed il controllo negativo (--/--) ($p=0,002$) (tabella C.14). Tutti le altre differenze fra i gruppi sono risultate significative e sono riportate nelle tabelle C.15., C.16., C.17..

Tabella C.12. Confronto fra i gruppi non vaccinati

GRUPPO	sintomatologia grave		Totale
	si	No	
--/CV	71 (53%)	49 (45%)	120
--/CO	62 (47%)	58 (55%)	120
Totale	133	107	240
$P = 0.2425$			

Tabella C.13. Confronto fra il gruppo V/CV e il controllo non vaccinati

GRUPPO	sintomatologia grave		totale
	si	No	
V/CV	1 (100%)	119 (49%)	120
--/--	0 (0%)	120 (51%)	120
Totale	1	239	240
$p = 0.3163$			

Tabella C.14. Confronto fra il gruppo V/CN e il controllo non vaccinati

GRUPPO	sintomatologia grave		totale
	si	No	
V/CN	8 (100%)	112 (48%)	120
--/--	0 (0%)	120 (52%)	120
Totale	8	232	240
$p = 0.002$			

Tabella C.15. Confronto fra i gruppi V/CV e V/CN

GRUPPO	sintomatologia grave		Totale
	si	No	
V/CV	1 (11%)	119 (52%)	120
V/CN	8 (89%)	112 (48%)	120
Totale	9	231	240
$p < 0.0174$			

Tabella C.17. Confronto fra i gruppi --/CV e V/CV

GRUPPO	sintomatologia grave		Totale
	si	no	
--/CV	71 (99%)	49 (29%)	120
V/CV	1 (1%)	119 (71%)	120
Totale	72	168	240
$p < 0.0001$			

Tabella C.18. Confronto fra i gruppi --/CN e V/CV

GRUPPO	sintomatologia grave		totale
	si	No	
--/CN	58 (89%)	62 (36%)	120
V/CN	8 (11%)	112 (64%)	120
Totale	66	174	240
$p < 0.0001$			

- Eliminazione virale

La differenza fra i due gruppi vaccinati e sottoposti a challenge (V/CV e V/CN) (tabella C.18), considerando il numero di animali che eliminano per tutti i giorni di campionamento, non è risultato statisticamente significativa ($p=0,8736$). Tutte le altre differenze fra i gruppi sono risultate essere statisticamente significative (tabelle C.19.-C.21)

Tabella C.18. Confronto fra i gruppi non vaccinati

GRUPPO	eliminazione virale		
	<i>si</i>	<i>no</i>	<i>totale</i>
--/CV	45 (51%)	35 (49%)	80
--/CN	44 (49%)	36 (51%)	80
Totale	89	71	160
$p=0,8736$			

Tabella C.19. Confronto fra i gruppi --/CV e V/CV

GRUPPO	eliminazione virale		
	<i>Si</i>	<i>no</i>	<i>totale</i>
--/CV	45 (68%)	35 (37%)	80
V/CV	21 (22%)	59 (63%)	80
Totale	66	94	160
$p=0,0001$			

Tabella C.20. Confronto fra i gruppi --/CN e V/CN

GRUPPO	eliminazione virale		
	<i>Si</i>	<i>no</i>	<i>totale</i>
--/CN	44 (69%)	36 (31%)	80
V/CN	30 (41%)	50 (69%)	80
Totale	74	86	160
$p=0,0264$			

Tabella C.21. Confronto fra i gruppi vaccinati

GRUPPO	eliminazione virale		
	<i>Si</i>	<i>no</i>	<i>totale</i>
V/CV	21 (41%)	59 (54%)	80
V/CN	30 (69%)	50 (46%)	80
Totale	51	109	160
$p=0,1268$			

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni si sono rese evidenti in Italia problematiche legate al controllo delle infezioni da AMPV nell'allevamento del tacchino. Il presente lavoro di tesi ha approfondito le cause della incompleta protezione vaccinale osservata in campo, dimostrando sperimentalmente l'evoluzione genomica ed antigenica del virus.

Gli studi longitudinali hanno innanzitutto evidenziato come in gruppi di tacchini vaccinati per AMPV sottotipo B ad un giorno di vita, l'infezione, con virus del medesimo sottotipo, avvenga in due momenti distinti della vita produttiva degli animali: a 2-4 settimane di età e, più tardivamente, a 10.

I ceppi AMPV evidenziati alle diverse età, all'analisi filogenetica, mostrano di appartenere a cluster distinti. In particolare i ceppi precoci sono vicini geneticamente, sia nella sequenza del gene F che del gene G, al vaccino somministrato agli animali e ciò ne fa supporre la possibile origine vaccinale. Catelli *et al.* (2006) hanno dimostrato come un vaccino vivo attenuato AMPV sottotipo A sia in grado di persistere in allevamento e riacquisire patogenicità. Tale ipotesi per il sottotipo B necessita del supporto dato dalla individuazione di robusti marker molecolari vaccinali, che si potranno ottenere mediante paragone di sequenza fra il genoma completo degli isolati precoci ed il vaccino. Importante sottolineare che in nessuno degli studi longitudinali è stata riportata sintomatologia clinica riferibile a TRT in concomitanza con gli isolamenti precoci per cui la virulenza di tali isolati andrà confermata con infezione sperimentale di tacchinotti sensibili in condizioni controllate.

Entrambi i gruppi vaccinati sottoposti ad indagine si sono infettati tardivamente con virus di campo sviluppando forme cliniche. L'osservazione di focolai di TRT in soggetti vaccinati si somma alle frequenti rotture vaccinali imputate alternativamente ai metodi e ai piani vaccinali, a scarsa durata dell'immunità o ad elusione dell'immunità vaccinale conseguente ad evoluzione genomica del virus di campo. (Pattison 1998; Banet –Noac *et al.*, 2005; Banet-Noac *et al.*, 2009)

Nel secondo studio è stata presa in considerazione quest'ultima ipotesi e sviluppata mediante analisi filogenetica di ceppi di AMPV sottotipo B isolati in Italia ed Europa nel periodo 1986-2007.

I risultati mostrano come nel periodo di circa 20 anni considerato, il genoma della proteina G sia andato incontro a importanti mutazioni mentre la sequenza della proteina F sia rimasta in gran parte immutata. L'analisi filogenetica indica che i ceppi Italiani isolati prima del 1994, pur formando un unico cluster con gli altri isolati Europei dello stesso periodo, risultano geneticamente più vicini agli italiani post-2000, quindi, con grande probabilità, ne sono i progenitori. Questi ultimi isolati hanno rimpiazzato in 20 anni i virus progenitori negli allevamenti del Veneto. Il meccanismo preciso che ha portato a quest'evoluzione del virus non può essere completamente descritto sulla base dei dati che sono a nostra disposizione. Da una parte i cambiamenti potrebbero essere stati causati da mutazioni impostesi nei virus circolando in volatili privi di immunità nei riguardi di AMPV. D'altra parte le mutazioni potrebbero essersi verificate per la pressione immunitaria indotta dalla esposizione degli animali a virus di campo o da vaccinazione con il vaccino sottotipo B largamente utilizzato in Veneto negli anni '90, che all'analisi filogenetica da noi condotta, rientra nel gruppo pre-1994. Sfortunatamente, poiché non ci sono dati di sequenze per il periodo critico fra il 1994 e il 2000, non ci è dato sapere se la velocità con cui si sono instaurate le mutazioni è aumentata dopo l'introduzione della vaccinazione. I cambiamenti osservati nella sequenza dedotta della proteina G coinvolgono tutti residui aminoacidici potenzialmente in grado di modificare l'antigenicità della proteina. Questo è vero per gli aminoacidi carichi e, poiché la proteina G è in larga parte glicosilata si può verosimilmente estendere alle mutazioni coinvolgenti i residui potenzialmente glicosilabili durante i processi post-traduzione, quali Serina e Treonina. Anche un recente studio Israeliano, riportando episodi di mancata protezione vaccinale, suggerisce come fattore determinante la presenza nella proteina G di 6-9 sostituzioni amminoacidiche non specificate (Banet-Noac *et al.*, 2009). Analogo quadro è stato riportato in uno studio sul virus respiratorio sinciziale del bovino (stessa sottofamiglia *pneumovirinae*) in cui l'analisi filogenetica del gene G di ceppi collezionati negli anni ha rivelato una continua evoluzione del virus, specie nei paesi dove la vaccinazione è stata ampiamente utilizzata. Gli autori ipotizzano che ciò possa aver determinato una perdita di cross protezione fra vaccino e ceppi di campo (Valarcher *et al.*, 2000).

Il confronto dell'intero genoma di due ceppi italiani rappresentativi dei due cluster (pre-1994 e post-2000) con il vaccino, aggiunge informazioni e conferma i dati di sequenza già discussi. Esso evidenzia come il ceppo più recente (2004) si discosti maggiormente dal vaccino rispetto al ceppo del 1987. Le differenze si confermano numerose nella proteina di superficie G ma emergono ancor più evidenti nella proteina SH. Per ambedue i geni le differenze sono più evidenti nella sequenza amminoacidica dedotta rispetto alla sequenza nucleotidica.

Fra queste proteine, la prima è stata più volte scelta per studi di epidemiologia molecolare (Bayon-Auboyer *et al.*, 1999; Cavanagh *et al.*, 1999; Alvarez *et al.*, 2003; Banet-Noach *et al.*, 2005; Chacon *et al.*, 2007; De Graaf *et al.*, 2008; Owoade *et al.*, 2008). Essa risulta completamente superflua per la sopravvivenza del virus in colture cellulari (Naylor *et al.*, 2004) ed anche, fino ad un certo punto, nel tacchino (Ling *et al.*, 2008), mostrandosi in questo modo non indispensabile al virus per l'adesione alla cellula. Anche la funzione della proteina SH è ancora oggetto di studio. Naylor *et al.* (2004) e Ling *et al.* (2008) hanno evidenziato che la sua presenza, al contrario di quanto osservato per la proteina G, è fondamentale per la sopravvivenza del virus sia *in vitro* che *in vivo*. Tacchini infettati sperimentalmente con AMPV delecto del gene SH non eliminano virus e mostrano titoli anticorpali molto ridotti o assenti. La funzione delle proteine di superficie è ancora quindi da chiarire e questi dati indicano che in qualche modo possano essere importanti per l'interazione con il sistema immunitario.

Nel terzo studio, mediante una prova di cross-protezione fra il vaccino e due ceppi rappresentativi dei cluster pre-1994 e post 2000, sequenziati nell'intero genoma assieme al vaccino, è stato verificato se le mutazioni genetiche riscontrate abbiano determinato nel virus cambiamenti antigenici tali da permettergli l'elusione della risposta immunitaria vaccinale. I risultati hanno confermato tale ipotesi poiché il 50% degli animali vaccinati ed inoculati con il ceppo del 2004 ha mostrato sintomatologia clinica grave, che non è stata mai osservata nel gruppo vaccinato sottoposto a challenge con il ceppo del 1987. Si può quindi affermare che AMPV sia evoluto in regioni antigeniche fondamentali tali da permettergli la parziale elusione dell'immunità indotta dalla vaccinazione. Inoltre, poiché la sintomatologia clinica nei controlli non vaccinati ha avuto intensità ed andamento completamente sovrapponibili per i due virus, non ci sono evidenze di evoluzione del virus in patogenicità.

L'analisi di sequenza del genoma completo dei due virus indica che le regioni coinvolte nell'evoluzione sono localizzate nei geni che codificano per le proteine di superficie G ed SH, nelle quali è stata evidenziata la maggiore variabilità. Si può supporre che le mutazioni abbiano modificato strutturalmente le proteine dei ceppi di campo rendendo meno agevole il riconoscimento del virus da parte della risposta immunitaria indotta dal vaccino.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Ankari Abdul-Rahman, Bradbury J.M., Naylor C.J., Worthington K.J., Payne-Johnson C., Jones R.C., 2001. *Avian pneumovirus infection in broiler chicks inoculated with Escherichia coli at different time intervals*. Avian Pathology, **30**: 257-267.
- Ali A. e Reynolds D.L., 1999. *A Reverse Transcription –Polymerase chain reaction for the detection of avian pneumovirus (Colorado strain)*. Avian Diseases, **43**: 600-603.
- Alkhalaf A.N., Ward L.A., Dearth R.N., Saif Y.M., 2002. *Pathogenicity, transmissibility, and tissue distribution of avian pneumovirus turkey poults*. Avian Diseases, **46**(3): 650-659.
- Alvarez R., Njenga M.K., Scott M., Seal B.S., 2004. *Development of a nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent assay using a synthetic peptide antigen for detection of avian metapneumovirus antibodies in turkey sera*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, **11**(2): 245-249.
- Alvarez R, Lwamba HM, Kapczynski DR, Njenga MK, Seal BS. 2003. *Nucleotid and predicted amino acid sequence-based analysis of the Avian Metapneumovirus type C cell attachment glycoprotein gene: phylogenetic analysis and molecular epidemiology of U.S. Pneumoviruses*. Journal of Clinical Microbiology; **41**: 1730-1735
- Anderson L.J., Hierholzer J.C., Tsou C., Hendry R.M., Fernie B.F., Stone Y., McIntosh K., 1985. *Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies*. Journal of Infectious Diseases, **151**: 626-633.

- Andral B., Louzis C., Trap D., Newmann J.A, Bennejean G., Gaumont R., 1985. *Respiratory Disease (Rhinotracheitis) in Turkeys in Brittany, France 1981-1982. I. Field Observations and Serology*. Avian Diseases, **29**:27-34.
- Anonimo, 1985. *Turkey rhinotracheitis of unknown aetiology in England and Wales*. Veterinary Record, **117**: 653-654.
- Anonimo, 1996. *Stato sanitario dell'allevamento avicolo nelle varie regioni italiane nel 1995*. Zootecnica International suppl. (6): 8-12.
- Arns W. e Hafez H.M., 1992. *Swollen head syndrome in poultry flocks in Brasil*. Proceedings of 41th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, California, 81-83.
- Aung YH, Liman M, Neumann U, Rautenschlein S. 2008. *Reproducibility of swollen sinuses in broilers by experimental infection with avian metapneumovirus subtypes A and B of turkey origin and their comparative pathogenesis*. Avian Pathology. ;**37**(1): 65-74.
- Banet-Noach C, Simanov L, Perk S., 2005. *Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens*. Avian Pathology, **34**(3): 220-226.
- Banet-Noach C, Simanov L, Laham-Karam N, Perk S, Bacharach E. 2009 *Longitudinal survey of avian metapneumoviruses in poultry in Israel: Infiltration of field strains into vaccinated flocks*. Avian Dis. DOI: 10.1637/8466-090408-Reg.1. In press.
- Baxter-Jones C., Wilding G.P., Grant M., 1986. *Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, **119**: 600-601.
- Baxter-Jones C., Grant M., Jones R.C., Wilding G.P., 1989. *A comparison of three methods for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus*. Avian Pathology, **18**: 91-98.
- Bayon-Auboyer M-H., Jestin V., Toquin D., Cherbonnel M., Eterradosi 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.

- Bayon-Auboyer M-H., Arnauld C., Toquin D., Eterradossi N., 2000. *Nucleotide sequence 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.
- Bidin Z., Stanisic Z., Curic S., Rusac I., Mikec M., 1990. *Rinotracheitis in turkeys. Clinical picture and specific serum antibody findings in the first report case of the disease in Yugoslavia*. Vet Arhiv, **60**: 59-67.
- Bell I.G. e Alexander D.J., 1990. *Failure to detect antibody to turkey rinotracheitis in Australian poultry flocks*. Australian Veterinary Record, **67**: 232-233.
- Bennet R.S., Mc Comb B., Shin H.J., Njenga M.K., Nagaraja K.V., Halvorson D.A., 2002. *Detection of Avian Pneumovirus in Wild Canada Geese (Branta canadensis) and Blue-Winged Teal (Anas discors)*. Avian Diseases, **46**: 1025-1029.
- Bennett R.S., La Rue R., Shaw D., Yu Q., Halvorson D., Nagaraja K.V., Njenga M.K., 2005. *A wild goose metapneumovirus containing a large attachment glycoprotein is avirulent but immunoprotective in domestic turkeys*. Journal of Virology, **79**: 14834-14845.
- Botchkov Y., Borisov A., Irza V., Okovytya T., Ovchinnikova E., Batchenko G., Manin T., Scherbakova L., Drygin V., Guseva E., 2002. *Serological and molecular biological evidence of avian pneumovirus infection in chickens in Russia*. Proceedings of the 11th European Poultry Conference, Bremen, Germany 6-10 Sept 2002, pp175.
- Broor S., Bharaj P., 2007. *Avian and Human Metapneumovirus*. In: Biology of Emerging Viruses: SARS, Avian and Human Influenza, Metapneumovirus, Nipah, West Nile, and Ross River Virus, published May 2007 Ann. N.Y. Acad. Sci., 1102: 66-85.
- Buys S.B. e Du Preez J.K., 1980. *A preliminary report on the isolation of a virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus*. Turkeys, **28**: 36.

- Buys S.B., Du Preez J.K., Els H.J., 1989a. *The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa*. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, **56**: 87-98.
- Buys S.B., Du Preez J.K., Els H.J., 1989b. *Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent*. Journal of the South African Veterinary Association, **60**: 221-222.
- Cadman H.F., Kelly P.J., Zhou R., Davelaar F., Mason P.R., 1994. *A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against poultry pathogens in ostriches (Struthio camelus) from Zimbabwe*. Avian Diseases, **38**: 621-625.
- Cane P.A., Matthews D.A., Pringle C.R., 1991. *Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses*. Journal of General Virology, **72**: 2091-2096.
- Canon R.M., Roe R.T., 1982. *Livestock disease surveys: a field manual for veterinarians*. Australian Bureau of Animal Health. Canberra, Australian Government Publishing Service, 17.
- Capua I., Norci C., Casaccia C., Weiss C., 1995. *Risultati di un programma di monitoraggio sierologico su un allevamento di tacchini da riproduzione*. Zootechnica International supp (2): 60-64.
- Capua I., 1998. *Relazione sullo stato sanitario dell'allevamento avicolo nel 1997*. La Selezione Veterinaria (8-9): 545-548.
- Capua I. e Lavazza A. 1999. *Principali patologie presenti nell'allevamento avicolo durante il 1998*. La Selezione Veterinaria (8-9): 533-541.
- Catelli E., 2006. *Dati epidemiologici sulle infezioni da pneumovirus aviare in Italia*. Atti del Convegno: Malattie Virali Respiratorie e problemi di produzione, giornata studio INTERVET, Bologna, 7 giugno, 2006, 19-23.
- Catelli E. e Lavazza A., 2000. *Relazione sullo stato sanitario dell'allevamento avicolo nel 2000*. La Selezione Veterinaria **11**: 963-970.
- Catelli E., Cook J.K.A., Chester J., Orbell S.J., Woods M.A., Baxendale W., Huggins M.B., 1998. *The use of virus isolation, histopathology and*

immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian Pneumovirus in chickens. Avian Pathology, 27: 632-640.

- Catelli E., De Marco M.A., Delogu M., Terregino C., Guberti V., 2001. *Serological evidence of avian pneumovirus infection in reared and free-living pheasants. Veterinary Record, 149: 56-58.*
- Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Matteo P., De Marco M.A., Ortali G., Pesente., Sarti L., Franciosi C. (2002). *Infezione da pneumovirus aviare nel tacchino da carne e nel boiler: indagini di campo. XLI Convegno Società Italiana Patologia Aviare, Forlì 3-4 ottobre 2002. Large Animals Review, 8 (6):109-110.*
- Catelli E., Cecchinato M., Delogu M., De Matteo P., Ortali G., Franciosi C., De Marco M.A., Naylor C.J. (2004). *Avian Pneumovirus infection in turkey and broiler farms in Italy: a virological, molecular and serological field survey. Italian Journal of Animal Science, 3(3): 287-292.*
- Catelli E., Cecchinato M., Savage C.E., Jones R.C., Naylor C.J., 2006. *Demonstration of loss attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. Vaccine, 24: 6476-6482.*
- Cavanagh D. e Barrett T., 1988. *Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. Virus Research, 11: 241-256.*
- Cavanagh D., Mawditt K., Shaw K., Britton P., Naylor C., 1997. *Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. Acta Veterinaria Hungarica, 45: 281-298.*
- 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.*
- Cecchinato M., Catelli E., Savage C.E., De Matteo P., Faenzi M., Naylor C.J., 2003. *Evidenza di pneumovirus aviare sottotipo A in corso di un focolaio di TRT in tacchini da carne in Italia. Atti del XLII Convegno della Società Italiana di Patologia Aviare, Forlì 2-3 ottobre 2003. Large Animal Review, 9(6): 121-122.*

- Cha R.M., Khatri M., Sharma J.M., 2006. *Mucosal immunity in avian metapneumovirus*. Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Coronavirus and Pneumovirus and complicating Pathogens Rauschholzhausen, Germany, 14-16 May 2006, 56-57.
- Chacón JL, Brandão PE, Buim M, Villarreal L, Ferreira AJ. 2007. *Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil*. Avian Pathology; **36**(5): 383-387
- Chary P., Njenga M.K., Sharma J.M., 2005. *Protection by recombinant viral proteins against a respiratory challenge with virulent avian metapneumovirus*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 108:427-432.
- Chettle N.J. e Wyeth P.J., 1988. *Turkey rhinotracheitis: detection of antibodies using an ELISA test*. British Veterinary Journal, **144**: 282-287.
- Collins M.S., Gough R.E., Lister S.A., Chettle N., Eddy R., 1986. *Further characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, **119**: 606.
- Collins M.S. e Gough R.E., 1988. *Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis*. Journal of General Virology, **69**: 909-916.
- Collins M.S., Gough R.E., Alexander D.J., 1993. *Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies*. Avian Pathology, **22**: 469-479.
- Cook J.K.A., 2000a. *Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens*. The Veterinary Journal, **160**: 118-125.
- Cook J.K.A., 2000b. *Avian Rhinotracheitis*. Revue scientifique technique. Office International des Epizooties, **19**(2): 602-613.
- Cook J.K.A. e Cavanagh D., 2002. *Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses)*. Avian Pathology, **31**: 117-132.

- Cook J.K.A., Dolby C.A., Southee D.J., Mockett A.P.A., 1988. *Demonstration of antibodies to turkey rhinotracheitis virus in serum from commercially reared flocks of chickens*. Avian Pathology, **17**: 403-410.
- Cook J.K.A., Ellis M.M., Dolby C.A., Holmes H.C., Finney P.M., Huggins M.B., 1989a. *A live attenuated turkey Rhinotracheitis Virus Vaccine.1. Stability of the Attenuated Strain*. Avian Pathology, **18**: 511-522.
- Cook J.K.A., Holmes H.C., Finney P.M., Ellis M.M., Huggins M.B., Dolby C.A., 1989b. *A live attenuated turkey Rhinotracheitis Virus Vaccine.2. The use of the attenuated strains as an experimental vaccine*. Avian Pathology, **18**: 523-534
- Cook J.K.A., Ellis M.M., Huggins M.B., 1991. *The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poultlets inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria*. Avian Pathology, **20**: 155-166.
- Cook J.K.A., Jones B.V., Ellis M.M., Li J., Cavanagh D., 1993a. *Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies*. Avian Pathology, **22**: 257-273.
- Cook J.K.A., Kinloch S., Ellis M.M., 1993b. *In vitro and in vivo studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from the two species*. Avian Pathology, **22**: 157-170.
- Cook J.K.A., Huggins M.B., Woods M.A., Orbell S.J., Mockett A.P.A., 1995. *Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus*. Veterinary Record, **136**: 392-393.
- Cook J.K.A., Huggins M.B., Orbell S.J., Senne D.A., 1999. *Preliminary antigenic characterization of avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA*. Avian Pathology, **28**: 607-619.
- Cook J.K.A., Chesher J., Orthel F., Woods M.A., Orbell S.J., Baxendale W., Huggins M.B., 2000. *Avian pneumovirus infection of laying hens: experimental studies*. Avian Pathology, **29**: 545-556.
- Cook J.K.A., Huggins M.B., Orbell S.J., Mawditt K., Cavanagh D., 2001. *Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl*. Avian Pathology, **30**: 233-242.

- Cordioli P., Brocchi E., Sacchi C., Gamba D., Pascucci S., De Simone F., 1990. Applicazione di un ELISA con anticorpi monoclonali nella diagnostica sierologica della rinotracheite del tacchino. Risultati preliminari. *Zootecnia International*, giugno, 54-57.
- Dalton J.R.F. e Cserep T., 2004. *The response of pheasant (Phasianus colchicus) to Pneumovirus (TRT) vaccine*. Proceeeding of 4th International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germania, 20-23 giugno 2004, 343-349.
- Dani M.A.C., Arns C.W., Durigon E.L., 1999. *Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates using reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction endonuclease analysis and sequencing of a G gene fragment*. *Avian Pathology*, **28**: 473-476.
- Decanini E.L., Miranda E.C., Le Gros F.X., 1991. *Swollen head syndrome in heavy breeders in Mexico*. Proceedings of 40th Western Poultry Disease Conference, Acapulco, Mexico, 158-161.
- De Graaf M, Osterhaus ADM, Fouchier RAM, Holmes EC. 2008. *Evolutionary dynamics of human and avian metapneumovirus*. *Journal of General Virology*; **89**: 2933-2942.
- Delogu M., De Marco M.A., Catelli E., Cecchinato M., Sperati Ruffoni L., Pesente P., Franciosi C., 2004. *Molecular and serological survey of avian pneumovirus infection in wild aquatic birds in Italy*. Proceeeding of 4th International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germania, 20-23 giugno2004, 282-286.
- Easton A.J., Domachowske J.B., Rosenberg H.F., 2004. *Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis*. *Clinical Microbiology Reviews*, **17**: 390-412.
- Elhafi G., Naylor C.J., Savage C.E., Jones R.C., 2004. *Microwave or autoclave treatments destroy the infectivity of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus but allow detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction*. *Avian Pathology*, **33**(3): 303-306.

- Engstrom B., Czifra G., Cavanagh D., 2000. *Appearance and disappearance of turkey rhinotracheitis (TRT) in Swedish turkey farms : a case report*. Proceedings of the 3rd International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, 14-17 June 2000, pp 214-217.
- Etteradossi N., Toquin D., Guittet M., Bennejean G., 1995. *Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge*. Journal of Veterinary Medicine B, **42**: 175-186.
- Fabris G. e D'Aprile P.N., 1990. *Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio*. ZOOTECNICA International (6), 36-40.
- Fabris G., Della Valentina M., Gavazzi L., Gozzini P., 1998a. *TRT nei tacchini. Indagine sierologica in animali vaccinati e non vaccinati*. La Selezione Veterinaria, 8-9: 645-654.
- Fabris G., Della Valentina M., Gavazzi L., Gozzini P., Tosi G., 1998b. *Up to date on the most frequent turkey diseases of the current year and serology investigation*. Proceedings of the 1st International Symposium on turkey diseases. Berlin, 19-21 februar 1998, 107-119.
- Forrester A., Davis C., Bradbury J., 2005. *Avian pneumovirus exacerbates Mycoplasma gallisepticum infections in Pheasants*. Proceedings of XIV World Veterinary Poultry Congress: final program and abstract book, 22-26 August 2005, Istanbul, Turkey, pp275.
- Ganapathy K., Jones R.C., Bradbury J.M., 1998. *Pathogenicity of in vivo-passaged Mycoplasma imitans in turkey poults in single infections and dual infections with rhinotracheitis virus*. Avian Pathology, **27**: 80-89.
- Ganapathy K., Cargill P.W., Jones R.C, Montiel E., 2005. *Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens*. Avian Pathology, **34**: 297-302.
- Ganapathy K., Cox W.C., Gough R.E., Cargill P., Montiel E., Jones R.C., 2007. *Protection in specific pathogen free chickens with live avian metapneumovirus and Newcastle disease virus vaccines applied singly or in combination*. Avian Pathology **36**(4):313-317.

- Gharaibeh SM, Algharaibeh GR., 2007. *Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan*. Poultry Science; **86**(8):1677-81
- Giraud P., Bennejean G., Guittet M., Toquin D., 1986. *Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus*. Veterinary Record, **119**: 606-607.
- Giraud P., Le Gros F.X., Guittet M., Bouquet J.F., Toquin D., Bennejean G., 1987. *Turkey rhinotracheitis: isolation of a viral agent and first trials with experimental inactivated and attenuated vaccines*. Proceedings of the 37th Western Poultry Disease Conference, **36**: 94-96.
- Giraud P., Gros F.X.le, Toquin D., Bouquet J.F., Bennejean G., 1988. *Turkey rhinotracheitis: viral identification of the causal agent*. Proceedings of the 37th Western Poultry Disease Conference, Davis 29 febbraio-2 marzo, California, USA, **37**: 61-62.
- Govindarajan D., Buchholz U.J., Samal S.K., 2006. *Recovery of avian pneumovirus subgroup C from cDNA: cross-recognition of avian and human metapneumovirus support protein*. Journal of Virology, **80**: 5790-5797.
- Gough R., Collins M.S., Cox W.J., Chettle N.J., 1988. *Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, geese, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus*. Veterinary Record, **123**: 58-59.
- Gough R.E., Cox W.J., Alexander D.J., 1990. *Examination of sera from game birds for antibodies against avian viruses*. Veterinary Record, **127**: 110-111.
- Gough R.E., Manvell R.J., Drury S.E.N., Pearson D.B., 1994. *Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens*. Veterinary Record, **134**: 353-354.
- Gough R.E., Drury S.E., Aldous E., Laing P.W., 2001. *Isolation and identification of avian pneumovirus from pheasant*. Veterinary Record, **149**: 312.
- Goyal S.M., Chiang S-J., Dar A.M., Nagaraja K.V., Shaw D.P., Halvorson D.A., Kapur V., 2000. *Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of*

respiratory illness in Minnesota turkeys. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **12**: 166-168.

- Gulati B.R., Cameron K.T., Seal B.S., Goyal S.M., Halvorson D.A., Njenga M.K., 2000. *Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant matrix protein for detection of avian pneumovirus antibodies*. Journal of Clinical Microbiology, **38**(11): 4010-4014.
- Guionie O., Toquin D., Sellal E., Bouley S., Zwingelstein F., Allèe C., Bougeard S., Lemiere S., Eteradossi N., 2007. *Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus*. Journal of Virological Methods, **139**(2):150-158.
- Hafez H.M. e Woernle H., 1989. *Turkey rhinotracheitis, serological results in Baden-Wurttemberg*. Tierarztliche Umschau, **44**: 369-376.
- Hafez H.M. e Lohren U., 1990. *Swollen head syndrome: clinical observations and examination in West Germany*. Dtsch Tieraerztl Wochenschr, **97**: 322-324.
- Hafez H.M. e Arns C., 1991. *Disinfection trials on turkey rhinotracheitis*. Proceedings of 24th World Veterinary Congress, Rio de Janeiro, Brazil: 295.
- Hafez H.M., 1992. *Comparative investigation of different tyrkey rhinotracheitis (TRT) virus isolates from different countries*. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift, **99**: 486-488.
- Hafez H.M., 1993. *The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review*. Arch.Geflugelk., 53(4):181-185.
- Hafez H.M., Hess M., Prusas C., Naylor C.J., Cananagh D., 2000. *Presence of Avian Pneumovirus Type A in Continental Europe During the 1980s*. Journal of Veterinary Medicine B, **47**: 629-663.
- Heffels-Redman U., Neumann U., Braune S., Cook J.K.A., Pruter J., 1998. *Serological evidence for susceptibility of sea gulls to avian pneumovirus (APV) infection*. Proceedings of International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauischholzhausen, 15-18 giugno 1998, 23-25.

- Hess M., Huggins M.B., Heincz U., 2004. *Hatchability, serology and virus excretion following in ovo vaccination of chickens with an avian metapneumovirus vaccine*. Avian Pathology, **33**(6): 576-580.
- Horner R., Parker M., Ratcliffe C., 2003. *A serological survey of wild helmeted guineafowl (Numidia Meleagris) in KwaZuluNatal Province, South Africa*. Proceeding of 13th Congress of the World Veterinary Poultry Association, Denver 19-23 luglio 2003, Colorado, USA, 85-86.
- Houadfi E., Hamam A., Vanmarcke J., Cook J.K.A., 1991. *Swollen head syndrome in broiler chickens in Morocco*. Proceedings of 40th Western Poultry Disease Conference, Acapulco, Mexico, 126-127.
- Jing L., Cook J.K.A., Brow T.D.K., Shaw K., Cavanagh D., 1993. *Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polimyrase chain reaction*. Avian Pathology, **22**: 771-783.
- Jirjis F.F., Noll S. L., Halvorson D. A., Nagaraja K. V., Shaw D. P., 2002. *Pathogenesis of Avian Pneumovirus Infection in Turkeys*. Veterinary Pathology, **39**:300-310.
- Jirjis F.F., Noll S.L., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., Martin F., Shaw D.P., 2004. *Effects of Bacterial Coinfection on the Pathogenesis of Avian Pneumovirus Infection in Turkey*. Avian Diseases, **48**: 34-49.
- Johnson P.R., Spriggs M.K., Olmsted R.A., Collins P.L., 1987. *The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins*. Proceedings of the National Accademy of Sciences, USA, **84**: 5625-5629.
- Jones R.C., 1996. *Avian Pneumovirus infection: questions still unanswered*. Avian Pathology **25**: 639-648.
- Jones R.C., 2002. *Pneumovirinae*. In: Jordan F., Pattison M., Alexander D., Faragher T., Poultry Diseases, 5th edition, 272-281.
- Jones R.C., Baxter-Jones C., Wilding G.P., Kelly D.F., 1986. *Demonstration of a candidate virus for turkey rhinotracheitis in experimentally inoculated turkeys*. Veterinary Record, **119**: 599-600.

- Jones R.C., Baxter-Jones C., Savage C.E., Kelly D.F., Wilding G.P., 1987. *Experimental infection of chickens with a ciliostatic agent isolated from turkeys with rhinotracheitis*. *Veterinary Record*, **120**: 301-302
- Jones R.C., Williams R.A., Baxter-Jones C., Savage C.E., Wilding G.P., 1988. *Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response*. *Avian Pathology*, **17**: 841-850.
- Jones R.C., Naylor C.J., Bradbury J.M., Savage C.E., Worthington K., Williams R.A., 1991. *Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England*. *Veterinary Record*, **129**: 509-510.
- Jones R.C., Naylor C.J., Al-Afaleq A., Worthington K.J., Jones R., 1992. *Effect of cyclophosphamide immunosuppression on the immunity of turkeys to viral rhinotracheitis*. *Research in Veterinary Science*, **53**: 38-41.
- Jones R.C., Khehra R.S., Naylor C.J., Cavanagh D., 1998. *Dual infection of tracheal organ cultures and chicks with infectious bronchitis virus and avian pneumovirus*. International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauischholzhausen, Germania, 15-18 giugno 1998, 97-105.
- Jones R.C., Karen J., Worthington K.J., Sargent B.A., 2000. *Some observation on serological responses to avian pneumoviruses in turkeys and chickens*. Proceedings of 3th International Symposium on Turkey Diseases, Berlino 14-17 giugno 2000, 244-248.
- Juhasz K. e 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.
- Kapczynski D.R. e Sellers H.S., 2003. *Immunization of turkeys with a DNA vaccine expressing either the F or N gene of avian metapneumovirus*. *Avian Disease*, **47**(4): 1376-1383.
- Kherha R.S., Jones R.C., Bradbury J.M., 1999. *Dual infection of turkey poults with avian pneumovirus and Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathology*, **28**:401-404.

- Khehra R.S. e Jones R.C., 1999. *In vitro and in vivo studies on the pathogenicity of avian pneumovirus for the chicken oviduct*. Avian Pathology, **28**: 257- 262.
- Kles V., Morin M., Picault J.P., Drouin P., Guittet M., Bennejean G., 1987. *Isolement d'un virus dans un cas de syndrome infectieux du gonflement de la tete avec coryza chez la pintade*. L'aviculteur, **483**:112.
- Kong B.W., Foster L.K., D.N. Foster, 2006. *Comparison of avian cell substrates for propagating subtype C avian metapneumovirus*. Virus Research, **116**:58-68.
- Lantos C., 1990. *Actual problems of poultry hygenes*. Baromfitenyesztes-es-Feldogozas, **37**: 54-58.
- Lee E.H., Song M.S., Shin J.Y., Lee Y.M., Kim C.J., Lee Y.S., Kim H., Choi Y.K., 2007. *Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from phaesants in a live bird market*. Virus Research, **128**:18-25.
- Li J., Cook J.K.A., Brown T.D.K., Shaw K., Cavanagh D., 1993. *Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction*. Avian Pathology, **22**: 771-783.
- Li J., Ling R., Randhawa J.S., Shaw K., Davis P.J., Juhasz K., Pringle C.R., Easton A.J., Cavanagh D., 1996. *Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses*. Virus Research, **41**: 185-191.
- Liman M. e Rautenschlein S., 2007. *Induction of local and systemic immune reactions following infection of turkeys with avian Metapneumovirus (aMPV) subtypes A and B*. Veterinary Immunology and Immunopathology, **115**:273-285.
- Ling R. e Pringle C.R., 1988. *Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis*. Journal of General Virology, **69**: 917-923.
- Ling R., Easton A.J., Pringle C.R., 1992. *Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses*. Journal of General Virology, **73**: 1709-1715.

- Ling R., Davis P.J., Yu Q., Wood C.M., Pringle C.R., Cavanagh D., Easton A.J., 1995. *Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus*. *Virus Research*, **36**: 247-257.
- Ling R., Sinkovic S., Toquin D., Guionie O., Eteradossi N., Easton A.J., 2008. *Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame*. *Journal of General Virology*, **89**: 525-533.
- Litjens J.B., Kleyn van Willigen F.C., Sinke M., 1989. *A case of swollen head syndrome in a flock of Guinea-fowl*. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, **114**: 719-720.
- Lu Y.S., Shien Y.S., Tsai H.J., Tseng C.S., Lee S.H., Lin D.F., 1994. *Swollen head syndrome in Taiwan – isolation of an avian pneumovirus and serological survey*. *Avian Pathology*, **23**: 169-174.
- Maharaj S.B., Thomson D.K., da Garcia J.V., 1994. *Isolation of an avian pneumovirus-like agent from broiler breeder chickens in South Africa*. *Veterinary Record*, **134**: 525-526.
- Maherchandani S., Munoz-Zanzi C.A., Patnayak D.P., Malik Y.S., Goyal S.M., 2004. *The effect of pooling sera on the detection of avian pneumovirus antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay test*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **16**(6): 497-502.
- Majò N., Allan G.M., O’Loan C.J., Pagès A., Ramis A.J., 1995. *A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus*. *Avian Diseases*, **39**: 887-896.
- Majò N., Gilbert X., Villafranca M., O’Loan C.J., Allan G.M., Costa L., Pagès A., Ramis A., 1997. *Tukey rhinotracheitis virus and Escherichia coli experimental infection in chickens: histopathological, immunocytological and microbiological study*. *Veterinary Microbiology*, **57**: 29-40.
- Malik Y.S., Patnayak D.P., Goyal S.M., 2004. *Detection of three avian respiratory viruses by single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay*. *Journal of Veterinarian Diagnostic Investigation*, **16**:244-248.

- Marien M., Decostere A., Martel A., Chiers K., Froyman R., Nauwynck H., 2005. *Synergy between avian pneumovirus and Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys*. Avian Pathology, **34**:204-211.
- Massi P., 1997. *Riepilogo delle principali patologie aviarie osservate nel corso del 1996 nelle diverse regioni italiane*. La Selezione Veterinaria (8-9): 537-541.
- McComb B., Bennet R., Shin H.J., Halvorson D.A., Jirjis F.J., Nagaraja K.V., 2001. *Wild Waterfowl as a source of Avian Pnneumovirus (APV) infection in domestic poultry*. Proceeding of the 50th Western Poultry Disease Conference, March 24-26, 2001 University of California, Davis, California, pp76-77.
- McDougall J.S. e Cook J.K.A., 1986. *Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations*. Veterinary Record, **118**: 206-207.
- Medina H.A., Seeley M., 2003. *Avian Pneumovirus (APV) and other respiratory challenges in turkeys in the midwest: an examination of envirometantal factors that induce a higher incidence in the spring and fall*. Proceeding of the 52th Western Poultry Disease Conference, March 8-10, 2003, Sacramento, California, pp38-39.
- Meini A., 1996. *Infezione da pneumovirus: rinotracheite del tacchino e swollen head sindrome del pollo*. Zootecnica international, 45-50.
- Mekkes D.R. e de Wit J.J., 1998. *Comparison of three commercial ELISA kits for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies*. Avian Pathology, **27**: 301-305.
- Minta Z., Bartnicka B., Bugajak P., 1995. *Serological surveillance of avian pneumovirus in chicken and turkey flocks in Poland*. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, **39**: 103-107.
- Morley A.J. e Thompson D.K., 1984. *Swollen head syndrome in broiler chickens*. Avian Disease, **28**: 238-243.
- Mufson M.A., Orvell C., Rafnar B., Norrby E., 1985. *Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus*. Journal of General Virology, **66**: 2111-2124.

- Nagaraja K.V., Shin H. J., Njenga M., Shaw D., Halvorson D.A., 2001. *Host range and Epidemiology of avian Pneumovirus infection*. Proceeding of the 50th Western Poultry Disease Conference, March 24-26, 2001 University of California, Davis, California, pp 80-81.
- Nagaraja K., Velayudhan B., Lopez V. C., Halvorson D. A., Bennet R. C., McComb B., Shaw D., 2005. *Pathogenesis of avian pneumovirus infections infection in two-week-old turkeys*. Proceeding of the 54th Western Poultry Disease Conference, April 25-27, 2005, Vancouver, B.C., Canada, pp49-51.
- Nakamura K., Mase M., Tanimura N., Yamaguchi S., Yuasa N., 1998. *Attempts to reproduce swollen head syndrome in specific pathogen free chickens by inoculating with Escherichia coli and/or turkey rhinotracheitis virus*. Avian Pathology, **27**: 21-27.
- Naylor C.J. e Jones R.C., 1993. *Turkey rinotracheitis virus: a review*. Veterinary Bulletin, **63**: 439-449.
- Naylor C.J. e Jones R.C., 1994. *Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine*. Vaccine, **12**(13): 1225-30.
- Naylor C.J., Al-Ankari A.R., Al-Afaleq A.I., Bradbury J.M., Jones R.C., 1992. *Exacerbation of Mycoplasma gallisepticum infection in turkeys by rhinotracheitis virus*. Avian Pathology, **21**: 295-305.
- Naylor C., Shaw K., Britton P., Cavanagh D., 1997a. *Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain*. Avian Pathology, **26**: 327-338.
- Naylor C.J., Worthington K.J., Jones R.C., 1997b. *Failure of maternal antibodies to protect young turkey poults against challenge with turkey rhinotracheitis virus*. Avian Disease, **41**: 968-971.
- Naylor C.J., Britton P., Cavanagh D., 1998. *The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtype A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus*. Journal of General Virology, **79**: 1393-1398.

- Naylor C.J., Cavanagh D., Jones R.C., 2002. *Live TRT vaccination in the UK: past, present and future*. Proceedings of 4th International Symposium on Turkey Diseases, Berlino 15-18 maggio 2002, 151-153.
- Naylor C.J., Brown P.A, Edworthy N., Ling R., Jones R.C., Savage C.E., Easton A.J., 2004. *Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus aviability*. Journal of General Virology, **85**: 3219-3227.
- Njenga K., Lwamba H., Bennett R., Halvorson D., 2007. *Epidemiologia dei pneumovirus aviari nel Midwest degli Stati Uniti*. Zootecnia International, **3**:52-55.
- Nunoya T., Tajjma M., Izuchi T., Takahashi K., Otaki Y., Nagasawa Y., Hakogi E., 1991. *Pathology of a broiler disease characterized by the swollen head*. Journal of Veterinary Medical Science, **53**: 347-349.
- O'Brien J.D.P., 1985. *Swollen head syndrome in broiler breeders*. Veterinary Record, **117**: 619-620.
- O'Loan C.J., Allan G.M., McNair J., Mackie D.P., McNulty M.S., 1990. *TRT virus serology: discrepancy between ELISA and indirect immunofluorescence*. Avian Pathology, **19**: 173-180.
- Owoade AA, Ducatez MF, Hübschen JM, Sausy A, Chen H, Guan Y, Muller CP. 2008. *Avian metapneumovirus subtype A in China and subtypes A and B in Nigeria*. Avian Disease; **52**(3):502-506.
- Patnayak D.P., Gulati B. R., Sheikh A.M., Goyal S.M., 2003. *Cold adapted avian pneumovirus for use as live, attenuated vaccine in turkeys*. Vaccine, **21**:1371-1374.
- Patnayak D.P. e Goyal S.M., 2004. *Duration of immunity produced by a live attenuated vaccine against avian pneumovirus type C*. Avian Pathology, **33**(5): 465-469.
- Pattison M., Chettle N., Randall C.J., Wyeth P.J., 1989. *Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens*. Veterinary Record, **125**: 229-231..

- Pattison M., 1998. *TRT in the field: field situation and control*. Proceedings and Technical Supplements of the Roche Avian Pneumovirus Workshop. Ed. S.R. Clark and L.M. Ginsburg. Roche Vitamins Inc., Parsippany NJ RCD 9713, 43-49.
- Pedersen J.C., Reynolds L., Ali A., 2000. *The sensitivity and specificity of a reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain)*. Avian Diseases, **44**: 681-685.
- Picault J.P., Giraud P., Drouin M., Guittet M., Bennejean G., Lamande J., Toquin D., Gueguen C., 1987. *Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome*. Veterinary Record, **121**: 135.
- Picault J. P, 1988. *La rinotracheite infettiva (RTI oTRT) e la sindrome infettiva da rigonfiamento della tetsa (SIGT o SHS)*. XXVII Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì 15-16 settembre 1988.
- Polland B., Hafez H.M., Vasicek L., 1992. *Turkey rhinotracheitis in Austria*. Wiener Tierärztliche Monatsschrift, **3**: 30-74.
- Pringle C.R., 1998. *Virus taxonomy - San Diego 1998*. Archives of Virology, **143**: 1449-1459.
- Qingzhong Y., Barrett T., Brown T.D.K., Cook J.K.A., Green P., Skinner M.A., Cavanagh D., 1994. *Protection against turkey rhinotracheitis pneumovirus (TRTV) induced by a fowlpox virus recombinant expressing the TRTV fusion glycoprotein (F)*. Vaccine, **12**: 569-573.
- Randhawa J.S., Wilson S.D., Tolley K.P., Cavanagh D., Pringle C.R., Easton A.J., 1996. *Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus*. Journal of General Virology, **77**: 3047-3051.
- Randhawa J.S., Marriott A.C., Pringle C.R., Easton A.J., 1997. *Rescue of synthetic minireplicons establishes the absence of the NS1 and NS2 genes from avian pneumovirus*. Journal of Virology, **71**: 9849-9854.
- Reed L.J. e Muench H., 1938. *A simple method for estimating fifty percent endpoints*. American Journal of Hygiene, **27**: 493-497.

- Ricchizzi E., E. Catelli, M. Cecchinato, C. Lupini, P. Brown and C.J. Naylor. (2008) *Disease associated with 7 week old isolation of an avian metapneumovirus vaccine derived virus*. Proceedings of the 7th International Symposium on Turkey Diseases. 19th - 21st June 2008, Berlin. (Ed. H.M.Hafez). Verlag der DVG Service GmbH - ISBN. 978-3-939902-96-6. pp. 171-175
- Rubbenstroth D., Ryll M., Behr K.P., Rautenschlein S., 2007. *Does avian metapneumovirus (aMPV) exacerbate disease caused by Riemerella Anatipestifer (RA) in turkeys?*. Proceedings of the 56th World Poultry Disease Conference, March 26-29 2007, Las Vegas, Nevada, pp25-28.
- Sarakbi T., 1989. *Head swelling syndrome, a new problem for Yemen*. Poultry, Misset Feb/March, 17
- Schiricke E., 1984. *La rhinotrachéite de la dinde: historique, évolution, symptômes et lésions moyens de lutte*. L'aviculteur, 442: 91-98.
- 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.
- Seal B.S., 2000. *Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America*. Animal Health Research Reviews, **1**(1): 67-72.
- Seal B.S., Sellers H.S., Meinersmann R.J., 2000. *Fusion protein predicted amino acid sequence of the first U.S. avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among the Paramyxoviridae*. Virus Research, **66**: 139-147.
- Senne D.A., Edson R.K., Pedersen J.C., Paigrahy B., 1997. *Avian pneumovirus update*. Proceedings of American Veterinary Medical Association, 134th Annual Congress. Reno, Nevada, USA, Ed. American Veterinary Medical Association, Schaumburg, IL, USA : 190.
- Sharma J.M., Chary P., Heather Gerbyshak-Szudy, 2002. *Immunopathogenesis of avian pneumovirus of turkeys*. Proceedings of 4th International Symposium on Turkey Diseases, Berlino 15-18 maggio 2002, 40..
- Shin H.J., Njenga M.K., McComb B., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., 2000a. *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**(11): 4282-4284.

- Shin H.J., McComb B., Back A., Shaw D.P., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., 2000b. *Susceptibility of Broiler Chicks to Infection by Avian Pneumovirus of Turkey Origin.* Avian Diseases, **44**: 797-802.
- Shin H.J., Cameron K.T., Jacobs J.A., Turpin E.A., Halvorson D.A., Goyal S.M., Nagaraja K.V., McComb B., Mahesh C.K., Lauer D.A., Seal B.S., Njenga M.K., 2002. *Molecular epidemiology of subtype C avian Pneumovirus isolated in the United States and comparison with subgroups A and B viruses.* Journal of Clinical Microbiology, **40**: 1687-1693.
- Stuart J.C., 1989. *Rinotracheitis: turkey rinotracheitis in Great Britain. In recent advances in turkey science.* Poultry Science Symposium Series No. 21, Eds. C. Nixey & T.C. Grey, Butterworth, London, 217-224.
- Sullender W.M., Mufson M.A., Anderson L.J., Wertz G.W., 1991. *Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses.* Journal of Virology, **65**: 5425-5434.
- Tanaka M., Takuma H., Kokumai N., Oishi E., Obi T., Hiramatsu K., Shimizu Y., 1995. *Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chickens with swollen head syndrome in Japan.* Journal of Veterinary Medical Science, **57**: 939-941.
- Tarpey I., Huggins M.B., Davis P.G., Shilleto R., Orbell S.J., Cook J.K.A., 2001. *Cloning, expression and immunogenicity of the avian pneumovirus (Colorado isolate) F protein.* Avian Pathology, **30**: 471-474.
- Tarpey I. & Huggins M.B., 2007. *Onset of immunity following in ovo delivery of avian metapneumovirus vaccines.* Veterinary Microbiology, **124**:134-139.
- Tiwari A., Patnayak D.P., Chander Y., Parsad M., Goyal S.M., 2007a. *Survival of two avian respiratory viruses on porous and nonporous surfaces.* Avian Diseases, **50**: 284-287.
- Tiwari A., Patnayak D.P., Chander Y., Goyal S.M., 2007b. *Permissibility of different cell types for the growth of avian metapneumovirus.* Journal of Virological Methods, **138**(1-2):80-84.

- Toquin D., Eterradossi N., Guittet M., 1996. *Use of a related ELISA antigens for efficient TRT serological testing following live vaccination.* Veterinary Record, **139**: 71-72.
- Toquin D., Bayon-Aboyer M.H., Eterradossi N., Morin H., Jestin V., 1999. *Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck.* Veterinary Record, **145**: 680.
- Toquin D., Bayon-Auboyer M-H., Senne D.A., Eterrodossi N., 2000. *Lack of antigenic relationship between French and recent North American non-A/non-B turkey rhinotracheitis virus.* Avian Diseases, **44**: 977-982.
- Toquin D., Guionie O., Jestin V., Zwingelstein F., Allee C., Eterodossi N., 2006a. *European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages.* Virus Genes, **32**: 97-103.
- Toquin D., Guionie O., Allee C., Morin Y., Le Coq L., Zwingelstein F., Jestin V., Eteradossi N., 2006b. *Compared susceptibility of SPF ducklings and SPF turkeys to the infection by avian metapneumoviruses belonging to the four subgroups.* Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Coronavirus and Pneumovirus Infections, Rauschholzhausen, Germany, 2006, 20-24 June 2006. WB Lauferweiler Verlag, Wettemberg, Germany, 2006, pp 70-76.
- Toro H., Hidalgo H., Ibanèz M., Hafez H.M., 1998. *Serologic Evidence of Pneumovirus in Chile.* Avian Diseases, **42**: 815-817.
- Townsend E., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., Shaw D.P., 2000. *Susceptibility of an avian pneumovirus isolated from Minnesota turkey to physical and chemical agents.* Avian Diseases, **44**: 336-342.
- Turpin E.A., Perkins L.E., Swayne D.E, 2002. *Experimental infection of turkeys with avian pneumovirus and either Newcastle disease virus or Escherichia coli.* Avian Diseases, **46**(2): 412-422.
- Turpin E., 2003. *Identification and Sequence Analysis of Avian Metapneumovirus in Wild Birds Outside of Endemic Areas.* Proceeding of 13th Congress of the World Veterinary Poultry Association, Denver 19-23 luglio 2003, Colorado, USA, 68.

- Turpin E.A., Lauer D.C., Swayne D.E., 2003. *Development and Evaluation of a Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Avian Metapneumovirus Type C-Specific Antibodies in Multiple Domestic Avian Species*. Journal of Clinical Microbiology, **41**(8): 3579-3583.
- Uramoto K., Hakogi E., Watanabe T., Ogura Y., Hataya M., Ohtsuki K., 1990. *Primary occurring of swollen head syndrome in Japanese broiler flocks*. Journal of Japanese Society on Poultry Disease, **26**: 247-253.
- Valarcher F., Schelcher F., Bourhy H. 2000. *Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus*. Journal of Virology, **74**: 10714-10728
- Van den Hoogen B.G., de Jong J.C., Groen J., Kuiken T., de Groot R., Foucher R.A.M., Osterhaus A.D.M.E., 2001. *A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease*. Nature Medicine, **7**: 719-724.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Cavanagh D., Pensaert M., 1998. *Infections and reinfections with avian pneumovirus subtype A and B on Belgian turkey farms and relation to respiratory problems*. Journal of Veterinary Medicine B, **45**: 621-626.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Cavanagh D., Pensaert M., 1999. *Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkey*. Avian Pathology, **28**: 239-244.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Naylor C., Pensaert M., 2000. *Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys*. Veterinary Record, **147**: 132-134.
- Van de Zande S., Nauwynck H., Pensaert M., 2001. *The clinical, pathological and microbiological outcome of an Escherichia coli O2:K1 infection in avian pneumovirus infected turkeys*. Veterinary Microbiology, **81**: 353-365.
- Van Loock M., Loods K., Van de Zande S., Van Heerden M., Nauwynck H., Goddeeris B.M, D. Vanrompay, 2006. *Pathogenic interactions between Chlamydoxyla psittaci and avian pneumovirus infections in turkeys*. Veterinary Microbiology, **112**:53-63.

- Velayudhan B.T., Lopes V.C., Noll S.L., Halvorson D.A., Nagaraja K.V., 2003. *Avian pneumovirus and its survival in poultry litter*. Avian Diseases, **47** (3):764-768.
- Velayudhan B.T., Nagaraja K.V., Thachil A.J., Shaw D.P., Gray G.C., Halvorson D.A., 2006. *Human Metapneumovirus in Turkey Poults*. Emerging Infectious Diseases, **12**(12):1853-1859.
- Villareal L.Y.B., Brandao P.E., Chacon J.L., Assayag M.S., Maiorka P.C., Raffi P., Saldenberg A.B.S., Jones R.C., A.J.P. Ferreira, 2007. *Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections*. Avian Diseases, **51**:900-904.
- Weisman Y., Strengel C., Blumenkranz R., Segal Y., 1988. *Turkey rhinotracheitis (TRT) in turkey flocks in Israel: virus isolation and serological response*. Proceedings of the 37th Western Poultry Disease Conference, Davis 29 febbraio-2 marzo, California, USA, **37**: 67-69.
- Welchman D.De B., Bradbury J.M., Cavanagh D., Aebischer N.J., 2002. *Infectious agents associated with respiratory disease in pheasants*. Veterinary Record, **150**: 658-664.
- Worthington K.J., Sargent B.A., Davelaar F.G., Jones R.C., 2000. *Immunity to TRT in turkeys following in ovo vaccination*. Proceedings of 3th International Symposium on Turkey Diseases, Berlino 14-17 giugno 2000, 249-255.
- Worthington K.J., Sargent B.A., Davelaar F.G., Jones R.C., 2003. *Immunity to avian pneumovirus infection in turkeys following in ovo vaccination with attenuated vaccine*. Vaccine, **21**: 1355-1362.
- Wyeth P.J., Gough R.E., Chettle N., Eddy R., 1986. *Preliminary observations on a virus associated with turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, **119**: 139.
- Wyeth P., 1990. *Turkey rhinotracheitis and swollen head syndrome cause heavy loss*. Poultry Digest, 16-21.
- Yu Q., Davis P.J., Barrett T., Binns M.M., Bournnell M.E., Cavanagh D., 1991. *Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory*

syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. Journal of General Virology, **72**: 75-81.

- Yu Q., Davis P.J., Brown T.D., Cavanagh D., 1992. *Sequence and in vitro expression of the M2 gene of turkey rhinotracheitis pneumovirus.* Journal of General Virology, **73**: 1355-1363.
- Yu Q., Barrett T., Brown T.D.K., Cook J.K.A., Green P., Skinner M., Cavanagh D., 1994. *Protection against turkey rhinotracheitis pneumovirus (TRTV) induced by a fowlpox virus recombinant expressing the TRTV fusion protein gene (F).* Vaccine, **12**: 569-573.