

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
EPIDEMIOLOGIA E CONTROLLO DELLE ZONOSI**

Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: VET/05

TITOLO TESI

**PROFILASSI VACCINALE PER AMPV: UN APPROCCIO
MOLECOLARE ALLE PROBLEMATICHE DI CAMPO**

Presentata da: ENRICO RICCHIZZI

Coordinatore Dottorato

Prof. Giovanni Poglayen

Relatore

Prof.ssa Elena Catelli

Esame finale anno 2010

Indice generale

INTRODUZIONE.....	4
1.EZIOLOGIA.....	6
1.1.TASSONOMIA.....	6
1.2.MORFOLOGIA.....	6
1.3.PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE.....	7
1.4.ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA.....	8
1.5.PROTEINE VIRALI.....	8
1.6.CICLO REPLICATIVO.....	10
1.7.SIEROTIPO E SOTTOTIPI.....	10
2.EPIDEMIOLOGIA.....	13
2.1.SPECIE SENSIBILI.....	13
2.2.DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA.....	14
2.3.SITUAZIONE ITALIANA.....	15
2.4.MODALITÀ DI TRASMISSIONE.....	16
3.PATOGENESI.....	17
3.1.TROPISMO VIRALE PER L' APPARATO RIPRODUTTORE.....	18
3.2.INTERAZIONI MOLECOLARE OSPITE-PATOGENO.....	19
4. SINTOMATOLOGIA.....	22
4.1.SINTOMATOLOGIA NEL TACCHINO.....	22
4.2.SINTOMATOLOGIA NEL POLLO.....	23
4.3.LA MALATTIA NEGLI ANIMALI IN DEPOSIZIONE.....	23
5.1.LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE.....	25
5.2.LESIONI ISTO-PATOLOGICHE.....	25
7.DIAGNOSI.....	28
7.1.DIAGNOSI CLINICA E ANATOMOPATOLOGICA.....	28
7.2.DIAGNOSI DIRETTA.....	28
7.2.1.ISOLAMENTO VIRALE.....	28
7.2.2.MICROSCOPIA ELETTRONICA.....	29
7.2.3.IMMUNOFLOURESCENZA ED IMMUNOPERROSSIDASI.....	29
7.2.4.IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE.....	29
7.3.DIAGNOSI INDIRETTA.....	30
8.CONTROLLO DELLA MALATTIA.....	33
8.1.TERAPIA.....	33
8.2.PROFILASSI INDIRETTA.....	33
8.3.POSSIBILE ERADICAZIONE.....	35
A.REVERSIONE A VIRULENZA DI UN VACCINO VIVO ATTENUATO AMPV SOTTOTIPO B	38
A.1.INTRODUZIONE.....	38
A.2.MATERIALI E METODI.....	39
A.2.1.1.Analisi filogenetica.....	39
A.2.1.2.Caratterizzazione molecolare dei ceppi AMPV di origine vaccinale.....	40
A.2.1.3.Valutazione della Virulenza del ceppo IT/Ty/129-08/04 di origine vaccinale.....	44
A.3.RISULTATI.....	46
A.3.1.Analisi filogenetica.....	46
A.3.2.Analisi di sequenza del genoma.....	46
A.3.3.Valutazione della Virulenza del ceppo IT/Ty/129-08/04 di origine vaccinale.....	47
A.4.DISCUSSIONE.....	50
B.CIRCOLAZIONE DI CAMPO DI UN CEPPA PATOGENO DI METAPNEUMOVIRUS	
AVIARE ORIGINATO DA VIRUS VACCINALE.....	52
B.1.INTRODUZIONE.....	52
B.2.MATERIALI E METODI.....	53
B.2.1.Identificazione dei marker vaccinali.....	53
B.2.2.Valutazione della virulenza del ceppo 259-01/03.....	53
B.3.RISULTATI.....	55

B.3.1. Identificazione dei marker vaccinali.....	55
B.3.2. Valutazione della virulenza del ceppo 259-01/03.....	55
B.4. DISCUSSIONE.....	58
C. INFEZIONE DA METAPNEUMOVIRUS AVIARE NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO DELLA GALLINA OVAIOLA: INDAGINI DI CAMPO.....	59
C.1. INTRODUZIONE.....	59
C.2. MATERIALI E METODI.....	60
C.2.1. PIANO SPERIMENTALE.....	60
C.2.1.1. Studio longitudinale n°1.....	60
C.2.1.2. Studio longitudinale n°2.....	60
C.2.1.3. CAMPIONAMENTI SINGOLI.....	61
C.2.1.4.1. Tamponi rinofaringei.....	61
C.2.1.4.2. Prelievi di sangue.....	61
C.2.2. DIAGNOSTICA MOLECOLARE MEDIANTE RT NESTED PCR SOTTOTIPO A E B SPECIFICA PER DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE DI AMPV.....	63
C.2.3. SIEROLOGIA.....	64
C.3. RISULTATI.....	66
C.3.1. Studio longitudinale A.....	66
C.3.2. Studio longitudinale B.....	68
C.3.3. Campionamenti singoli.....	68
C.4. DISCUSSIONI.....	70
CONCLUSIONI.....	72
BIBLIOGRAFIA.....	73

INTRODUZIONE

Il *Metapneumovirus* aviare (AMPV) è l'agente eziologico della Rinotracheite del Tacchino (TRT). Tale malattia si presenta come una infezione del tratto respiratorio superiore, comunemente complicata da infezioni batteriche secondarie e caratterizzata da un'elevata morbilità e da variabile mortalità. Lo stesso virus è responsabile d'infezioni respiratorie nel pollo, nel fagiano e nella faraona ed è coinvolto, nel pollo, nell'eziologia della Sindrome della Testa Gonfia, patologia multifattoriale la cui patogenesi, ancora oggi, non è stata del tutto chiarita. AMPV è causa di cali dell'ovodeposizione nei riproduttori e nelle ovaiole per la produzione di uova da consumo. Sono stati sino ad ora identificati quattro sottotipi virali denominati A, B, C e D.

La TRT viene segnalata per la prima volta alla fine degli anni '70 in Sud Africa per poi diffondersi rapidamente in tutti i continenti, ad eccezione dell'Oceania. Oggi rappresenta una delle principali forme respiratorie ad eziologia virale dell'allevamento del tacchino.

Alla fine degli anni '80 la TRT compare anche in Italia nell'allevamento del tacchino e l'infezione si diffonde nel tempo a tutte le specie sensibili. Attualmente è endemica nelle regioni italiane a maggior vocazione avicola quali Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna, dove la vaccinazione è ampiamente utilizzata per il controllo delle forme cliniche sia nei soggetti in accrescimento che da riproduzione o produzione di uova da consumo.

Nei primi anni dopo la comparsa della malattia, allo scopo di determinare la migliore modalità di somministrazione, il vaccino fu impiegato nel tacchino a "spot", per via oculare o spray, a dosi variabili e non standardizzate. Dalla fine del 2001, la vaccinazione ha cominciato ad essere praticata a tappeto ed è divenuta standard la modalità di somministrazione ad un giorno di vita, via spray, in incubatoio. Se da un lato la pratica vaccinale sino ad ora ha tenuto in gran parte la malattia sotto controllo in questa specie, da un altro ha aperto nuove problematiche. Negli allevamenti di tacchino vaccinati si osservano infatti ancora focolai di TRT sia precoci che tardivi. Fra le possibili cause la presente tesi prende in considerazione la riacquisizione di patogenicità da parte di vaccini vivi attenuati. Essa viene dimostrata mediante caratterizzazione molecolare degli isolati e valutazione, *in vivo*, della patogenicità. Nel primo studio della presente tesi è dimostrata per la prima volta la reversione a virulenza di un vaccino sottotipo B, nel successivo si riporta un focolaio di TRT tardivo da virus di origine vaccinale sottotipo A.

Nell'allevamento della gallina ovaiole per la produzione di uova da consumo, d'altro canto, a causa delle scarse e frammentarie informazioni riguardo la diffusione dell'infezione in questo settore produttivo, e la mancanza di lavori scientifici sull'argomento, non si è ancora giunti alla definizione di piani vaccinali di comprovata efficacia. Allo scopo di delineare un quadro della situazione di campo il più possibile aderente alla realtà e sulla base di questo sviluppare adeguati piani profilattici nel terzo studio della presente tesi, è stata sul territorio nazionale, un'indagine sulla diffusione di AMPV nell'allevamento della gallina ovaiole. Il progetto ha previsto in particolare studi longitudinali e campionamenti singoli in allevamenti per la produzione di uova da consumo sia in fase pollastra che ovaiole, per la ricerca di AMPV abbinando tecniche diagnostiche sierologiche e di biologia molecolare. Dove possibile i risultati sono stati integrati con i dati produttivi dell'allevamento e gli eventuali piani vaccinali applicati.

PARTE GENERALE

1. EZIOLOGIA

1.1. TASSONOMIA

Il *Metapneumovirus* aviare (AMPV) appartiene all'ordine *Mononegavirales* che raggruppa virus a RNA a singolo filamento non segmentato a polarità negativa. È collocato nella famiglia *Paramixoviridae*, sottofamiglia *Pneumovirinae*, genere *Metapneumovirus* del quale è la specie tipo. Si tratta di virus pleomorfi, che sono costituiti da un nucleocapside a simmetria elicoidale e sono avvolti esternamente da envelope.

Nella famiglia *Paramyxoviridae* sono descritte due sottofamiglie:

- *Paramixovirinae*, a cui, tra gli altri generi, appartiene il genere *Avulavirus* al quale appartengono il Paramixovirus 1 della Malattia di Newcastle e gli altri Paramixovirus aviari.
- *Pneumovirinae* che comprende due generi: *Pneumovirus*, nel quale sono raggruppati i virus respiratori sinciziali (respiratory syncytial viruses: RSV) dell'uomo (hRSV), del bovino (bRSV), degli ovi-caprini, il virus della polmonite del topo; e il *Metapneumovirus* (Pringle, 1998) nel quale sono presenti il Metapneumovirus aviare e quello umano, evidenziato per la prima volta nel 2001 da 28 bambini colpiti da forma respiratoria in Olanda (Van den Hoogen *et al.*, 2001).

1.2. MORFOLOGIA

La microscopia elettronica ha messo in evidenza le somiglianze con gli altri membri della famiglia *Paramixoviridae*. Generalmente pleomorfi, i virioni possono essere sferici, con diametro altamente variabile (da 80 a 200 nm, talvolta sino a 500nm), o assumere forme bizzarre con lunghe proiezioni filamentose (Figura 1). Le differenze funzionali basate sulla struttura dei virioni non sono note; quelle osservate si ritiene derivino unicamente dal tipo di cellula usato per l'infezione (Easton *et al.*, 2004).

Il virione è avvolto da un envelope lipidico derivante dalla membrana plasmatica della cellula ospite nel quale sono ancorate tre glicoproteine virali: la proteina di attacco (G), la proteina di fusione (F) e una piccola proteina idrofobia (SH, *small hydrofobic*). La proteina F è una proteina transmembrana e presenta la porzione amino-terminale verso l'esterno del virione mentre la corta coda carbossi-terminale è rivolta nella regione interna. La proteina G presenta la porzione carbossi-terminale all'esterno mentre l'amino-terminale all'interno. Queste due proteine rappresentano gli spikes, le proiezioni che si osservano sulla superficie dell'envelope ed hanno lunghezza che varia tra 10 e 15 nm. Le proteine F e G prendono contatto con la proteina di matrice (M) che forma una impalcatura sul lato interno dell'envelope. I dettagli sulle interazioni tra queste proteine non sono stati ancora chiariti.



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

Il nucleocapside elicoidale è collocato all'interno dell'impalcatura costituita dalla proteina M ed include il genoma. Questo è un RNA singolo filamento non segmentato a polarità negativa associato ad una nucleoproteina virale (N), una polimerasi (L, *large proteine*), una fosfoproteina (P) (Figura 2). La struttura del nucleocapside, elicoidale, presenta un'altezza di 7 nm per spira ed un diametro di 14 nm. Queste dimensioni sono caratteristiche perché permettono il differenziamento dai *paramyxovirus* che hanno diametro maggiore (18nm) e altezza minore (Bhella *et al.*, 2002). Infine, *AMPV* è privo di emoagglutinine, per cui non presenta attività emoagglutinante verso gli eritrociti di tacchino, di pollo e dei mammiferi (Wyeth *et al.*, 1986; Buys *et al.*, 1989a). Non possiede inoltre neuroaminidasi.

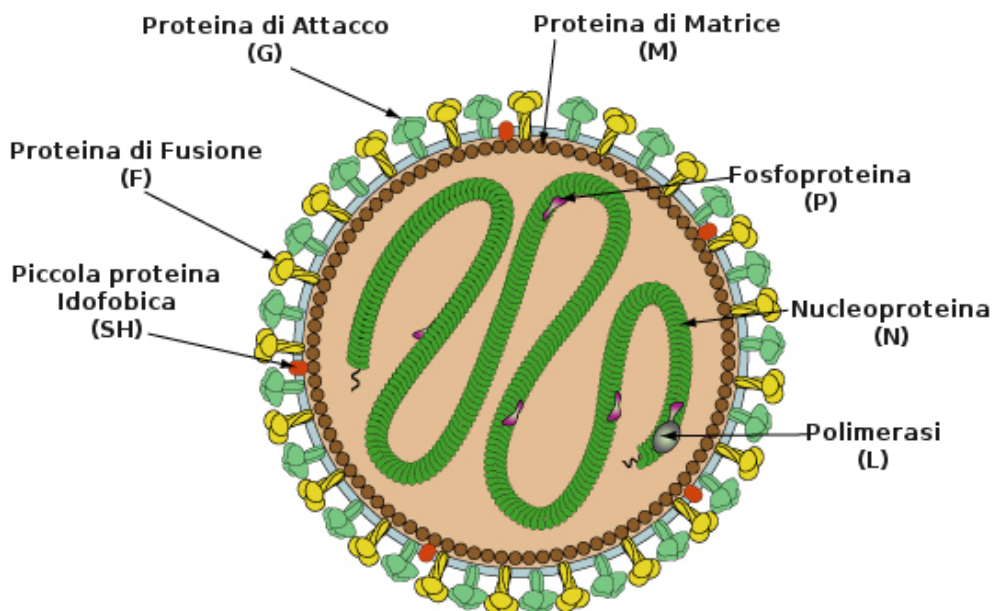


Figura 2: Rappresentazione schematica di un metapneumovirus.

1.3. PROPRIETÀ CHIMICO FISICHE

Studi effettuati sui sottotipi A e B hanno dimostrato che il virus è stabile in 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, quali aldeidi, alcoli, acidi organici e acqua distillata, inattivano il virus in 15 minuti alla concentrazione dello 0,55% (Hafez e Arns, 1991).

È stata recentemente studiata, negli Stati Uniti, 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) hanno riportato come sia possibile evidenziare il virus nella lettiera stoccata a 8°C per 90 giorni mediante PCR e 30 giorni con l'isolamento virale. Quando la lettiera viene stoccata a temperatura ambiente il virus può essere evidenziato fino a 30 giorni con la 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.

1.4. ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA

La lunghezza del genoma di un metapneumovirus è di circa 13 Kb. Una caratteristica unica del genere *Pneumovirinae* rispetto ai virus appartenenti al genere *Paramixovirinae* è quella di possedere il gene che codifica per le proteine M2. Sono presenti sequenze regolatorie ad ogni terminus. Quella al 3' dirige sia la replicazione che la trascrizione, mentre quella al 5' contiene il segnale per la replicazione dell'antigenoma sul quale verrà effettuata la sintesi della progenie virale.

Il genoma viene codificato in 8 mRNA differenti, una quantità maggiore rispetto ai 6,7 degli altri *Paramyxovirinae*. Ogni unità è separata da piccoli segmenti di sequenze non trascrizionali. Da vari 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 nel metapneumovirus aviare (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') (Figura 3) 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 (lunghi circa 15Kb), spiega perché il metapneumovirus aviare ha un genoma di sole 13,3 kb (Randhawa *et al.*, 1996). Proprio per queste differenze, il pneumovirus aviare è stato classificato come appartenente al nuovo genere *Metapneumovirus* (Pringle, 1998).



Figura 3: Rappresentazione della struttura genomica dei virus del genere *Metapneumovirus* (da Viralzone http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/89.html).

1.5. PROTEINE VIRALI

Alcune delle conoscenze riguardo la struttura e la funzione di queste proteine non deriva direttamente da studi condotti sul pneumovirus aviare ma da studi effettuati su virus appartenenti alla stessa sottofamiglia o famiglia. Le conoscenze più approfondite si hanno dalle caratterizzazioni molecolari su hRSV che è il più studiato tra i virus appartenenti alla sottofamiglia dei *Pneumovirinae* (Easton *et al.*, 2004).

Proteina del nucleocapside (N). E' parte integrante del complesso del nucleocapside ed è inoltre una componente fondamentale del complesso della polimerasi. E' lo stampo per la trascrizione e la replicazione dal momento che il solo genoma non può espletare questa funzione senza il supporto di questa proteina. Si ritiene che la proteina del nucleocapside sia responsabile della struttura ad elica del genoma. La sequenza confrontata con quella del metapneumovirus umano e con quella del virus sinciziale umano (tutti *Pneumovirinae*) presenta diverse regioni di omologia (Li *et al.*, 1996). Garcia-Barreno *et al.* (1996) hanno descritto al terminale amminico il dominio di interazione con l'RNA ed al terminale carbossilico quello di interazione con la proteina P. Recentemente è stata messa in evidenza la natura policistronica potenziale del gene N nei *AMPV* sottotipo A e *AMPV* sottotipo C (Alvarez e Seal, 2005).

Fosfo proteina (P). E' componente essenziale nei complessi di trascrizione e replicazione (Satake *et al.*, 1984; Lambden 1985, Barr *et al.*, 1994, Li *et al.*, 1996, van den Hoogen *et al.*, 2001). Analisi delle interazioni tra le proteine P ed N ha dimostrato come il dominio carbossiterminale di P contenga elementi necessari per il legame con la proteina N. La proteina P è fosforilata in specifici residui di serina, molti dei quali non sono essenziali per la trascrizione e la replicazione (Dupuy *et al.*, 1999).

Polimerasi (L). Per analogia con altri virus si ritiene che questa sia l'elemento principale del complesso della RNA polimerasi virale che è responsabile della sintesi di tutti gli RNA virali, inclusi gli mRNA, intermedi di replicazione, e l'RNA della progenie virale. E' inoltre

responsabile della metilazione e del capping. Il prodotto proteico ha elevato peso molecolare: 200 kDA. Sono stati descritti 6 domini proteici conservati con altri virus RNA negativi, inclusi 3 domini funzionali e distinte regioni tra i domini che fungono da cerniere per assemblare i domini funzionali nella conformazione appropriata (Poch *et al.*, 1990).

Proteina di matrice (M). Questa proteina è associata alla faccia interna della membrana lipidica delle cellule infette. Contiene un dominio idrofobico sul versante carbossilico. La funzione della proteina M di virus RNA negativi non segmentati si ritiene essere quella di inibitore della capacità trascrizionale del nucleocapside prima del packaging e di promuovere l'associazione del complesso del nucleocapside con il nascente envelope (Teng *et al.*, 1998, Ghildyal *et al.*, 2002).

Proteina di matrice (M2). Il gene codificante per questa proteina contiene 2 ORF sovrapposti (Ahmadian *et al.*, 1999). Il primo si trova a livello del codone AUG in posizione nucleotidica 14 al 5' e il gene termina a livello del codone UAA in posizione 574 e codifica per la proteina M2-1 che è coinvolta con la sintesi dell'RNA virale. L'espressione del gene M2 promuove la produzione di mRNA virali completi (Fearnly *et al.*, 1999); la mancanza risulta in una produzione di mRNA incompleti (Collins *et al.*, 1995). Queste evidenze suggeriscono si tratti di un fattore di elongazione (Collins *et al.*, 1996). Il prodotto del secondo ORF (inizia con AUG in posizione nucleotidica 531 e termina a livello del codone UAG in posizione nucleotidica 752), la proteina M2-2, non è stato ancora evidenziato in cellule infettate con *AMPV*; da uno studio condotto sul hRSV, l'accumulo di questa proteina svolge la funzione di switch tra fase di replicazione e fase di assemblaggio prima del rilascio del virione.

Piccola proteina idrofobica (SH). Le proteine SH sono piccole proteine integrali dell'envelope. Sono ancorate alla membrana mediante una porzione idrofobica (Feldman *et al.*, 2001). La funzione precisa di questa proteina non è ancora conosciuta. La delezione dei geni SH e G non preclude né l'attacco, né la capacità di infettare e l'assemblaggio del virione (Naylor *et al.*, 2004).

Proteina di attacco (G). E' la proteina responsabile dell'attacco del virus sulla superficie cellulare. Sul virus sinciziale umano (hRSV) questo è stato dimostrato utilizzando anticorpi policlonali contro questa glicoproteina; il risultato è stato un blocco dell'assorbimento del virus sulla superficie delle cellule bersaglio (Levine *et al.*, 1987). Se la sequenza genica viene confrontata con quella dei geni delle proteine HN ed N degli altri virus della famiglia Paramixoviridae non si riscontra alcuna analogia né nella sequenza né nella struttura. Queste proteine sono glicosilate sia nel terminale amminico che carbossilico. Il ruolo di queste glicosilazioni non è stato ancora spiegato ma probabilmente servono da elemento mimetico verso il sistema immunitario utilizzando zuccheri provenienti dalla cellula ospite. L'utilizzo di siti diversi di glicosilazione può rappresentare una forma di variabilità all'interno di una popolazione virale geneticamente omogenea. E' stato osservato come la risposta immunitaria imprime una forte pressione selettiva verso le variabili della proteina G (Garcia-Barreno *et al.*, 1996).

Proteina di fusione (F). L'inibizione di questa proteina previene la formazione di sincizi nelle colture cellulari infettate sperimentalmente. Come osservato nel hRSV la proteina è sintetizzata come precursore inattivo che si assembla come omo-oligomero nel reticolo endoplasmatico rugoso, formando strutture che si ritengono essere un singolo spikes glicoproteico (Collins *et al.*, 1995). Quando il precursore giunge al Golgi viene attivato, mediante clivaggio, in due unità unite da ponte disolfuro a livello di un sito sensibile alla furina (Arg-X-X-Arg) (Zimmer *et al.*, 2001; 2002). Il piccolo peptide risultante dal clivaggio (circa 27 aminoacidi) non rimane associato alla proteina F (Begona Ruiz-Arguello *et al.*, 2002) e sembra essere implicato in un meccanismo di evasione dall'immunità. Uno studio condotto da Brown *et al.* (2009) ha evidenziato la presenza nell'ectodominio di due regioni riconosciute da anticorpi neutralizzanti, gli autori indicano queste regioni come potenziali target per il design di nuovi vaccini. La proteina di fusione F è stata recentemente dimostrata il principale determinante del tropismo di specie: HMPV, modificati per esprimere la proteina F di un ceppo AMPV-C, erano in grado di infettare efficientemente un substrato permissivo al solo

sottotipo C (de Graff *et al.*, 2009).

1.6. CICLO REPLICATIVO

Trascrizione. Il modello corrente proposto per la trascrizione del genoma dell'*AMPV* è essenzialmente quello proposto per i virus RNA negativi a genoma non segmentato (Easton *et al.*, 2004). Il genoma virale contiene un solo sito di attacco per la polimerasi posizionato al terminale 3'. Il complesso della polimerasi inizia la trascrizione a livello di una sequenza start conservata in tutti i geni espressi. La polimerasi procede lungo il genoma sino al raggiungimento di un'altra sequenza conservata che identifica la terminazione della trascrizione. Il mRNA nascente viene metilato per formare una struttura definita CAP che promuove la traduzione sui ribosomi della cellula ospite. Nei pneumovirus la sequenza stop contiene una breve ripetizione di Uracile (U), questa indica anche la porzione del trascritto dove viene aggiunta la coda poliadenilata. Al completamento di questo processo l'mRNA viene rilasciato per essere trascritto da ribosomi liberi o associati al reticolo endoplasmatico rugoso, a seconda della destinazione finale della proteina espressa. A questo punto la polimerasi non procede automaticamente lungo il genoma. Si è stimato che un solo un 50% dei complessi di trascrizione sono in grado di continuare. Le polimerasi che si dissociano traslocano verso il terminale 3' della regione leader per iniziare la trascrizione dal primo gene. Le rimanenti proseguono lungo il genoma sino al raggiungimento del codone start di un nuovo gene. Questo meccanismo si verifica ogni volta che deve essere trascritto un gene. L'effetto finale è quello di creare un gradiente di trascrizione nel quale i geni presenti al terminale 3' risultano più abbondanti di quelli vicini al terminale 5' (Krempl *et al.*, 2002). Le regioni intergeniche dei pneumovirus sono di lunghezza variabile e tollerano l'inserzione di nucleotidi aggiuntivi (Bastien *et al.*, 2003, Chambers *et al.*, 1990).

Replicazione. Il modello corrente si basa su quello della replicazione di virus RNA negativi non segmentati (Easton *et al.*, 2004). Viene proposto il nucleocapside come una unità funzionale sia per il processo di replicazione che di traduzione. Le proteine N, L e P sono coinvolte in entrambe questi processi. La polimerasi lega il terminale 3' iniziando la replicazione del genoma ex novo. Questa procede sino alla completa trascrizione, così da ottenere un antigenoma che funge da stampo per i genomi della nuova progenie virale. La polimerasi lega il terminale 3' dello stampo per iniziare la sintesi dell'RNA. Non è ancora chiaro come la polimerasi sia in grado di variare da complesso di trascrizione a complesso di replicazione.

Packaging ed assemblaggio. Esperimenti di reverse genetics hanno suggerito che l'accumulo della proteina M potrebbe essere una delle componenti che iniziano il processo di assemblaggio dei virioni (Teng *et al.*, 1998). Il complesso nucleocapside/proteina M si associa con la coda delle glicoproteine maggiori inserite nella membrana delle cellule infette dopo la processazione attraverso il Golgi. Studi condotti su altri virus della famiglia Paramyxoviridae hanno messo in evidenza una serie di progressive interazioni tra le glicoproteine e la proteina M la quale agisce da ponte con il nucleocapside. Il risultato di tale interazione sono i virioni che gemmano in forma filamentosa dalla superficie cellulare (Parry *et al.*, 1979).

1.7. SIEROTIPO E SOTTOTIPI

Baxter-Jones *et al.* (1987) 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 il pneumovirus aviare 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.* (1993a) 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.

Successivamente, questi risultati furono confermati dall'analisi della sequenza amminoacidica della glicoproteina G e della sequenza nucleotidica del relativo gene (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.* (1993), di tipo A.

Per diversi anni si è creduto che il sottogruppo A fosse presente solo in Gran Bretagna e in Sud Africa, e che il sottogruppo 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 del pneumovirus aviare 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 due 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%.

Recentemente, negli Stati Uniti, è emerso un terzo sottotipo di *AMPV* (Senne *et al.*, 1997). Questo evento è importante non solo perché rappresenta la comparsa del pneumovirus aviare nel Nord America, area precedentemente ritenuta libera dall'infezione da *AMPV*, ma soprattutto perché questo virus differisce per alcuni aspetti dai sottotipi A e B (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 sottotipo A (Cook *et al.*, 1999).

Studi molecolari hanno poi confermato queste differenze. Il primo gene del pneumovirus aviare 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). 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 il ceppo Colorado è filogeneticamente separato dai sottotipi A e B, e di conseguenza rappresenta 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 sequenziazione 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 4).

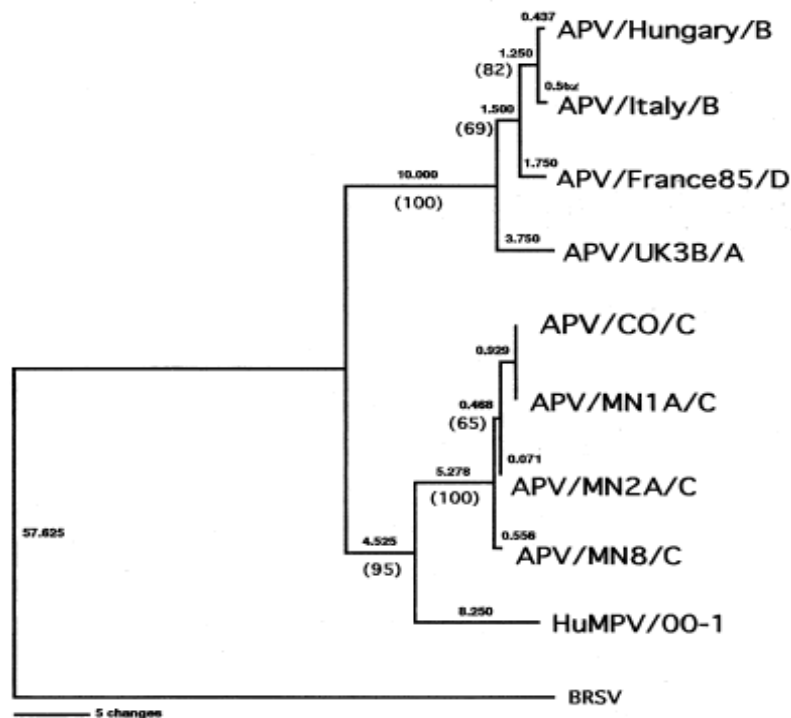


Figura 4: Analisi filogenetica delle sequenze nucleotidiche di parte del gene F di alcuni Pneumovirus. Si osserva come AMPV sottotipo A (AMPV/A), B (AMPV/B) e D (AMPV/D) siano maggiormente correlati tra loro rispetto al sottotipo C (AMPV/C) (Njienga *et al.*, 2003).

2. EPIDEMIOLOGIA

2.1. SPECIE SENSIBILI

Sono considerati ospiti naturali del metapneumovirus aviare il tacchino, specie senza dubbio più sensibile, ed il pollo. Il tacchino è stata la prima specie in cui è stata osservata la malattia (Buys e Du Preez, 1980) tanto che AMPV viene anche chiamato comunemente virus della Rinotracheite Infettiva del Tacchino (Turkey Rhinotracheitis Virus -TRTV). Nel pollo il ruolo primario del virus è modesto, tuttavia può essere causa scatenante di una grave patologia a eziologia complessa, la Sindrome della Testa Gonfia (Swollen Head Syndrome – SHS).

Solo altre due specie aviari sono risultate sensibili a seguito di infezione sperimentale e precisamente il fagiano e la faraona (Gough *et al.*, 1988). In quest'ultima specie sono state anche osservate infezioni cliniche (Litjens *et al.*, 1980) che in aggiunta al ritrovamento di faraone selvatiche positive sierologicamente ad AMPV nei dintorni di allevamenti di polli (Horner *et al.*, 2003) suggeriscono che questa specie possa avere un ruolo nella trasmissione virale. Le prime indagini sierologiche eseguite in fagiani d'allevamento hanno dato esito negativo (Bell e Alexander, 1990; Gough *et al.*, 1990), ma Gough *et al.* (2001) e Welchman *et al.* (2002) in Gran Bretagna sono stati in grado rispettivamente di isolare AMPV ed evidenziare il virus del sottotipo A e B mediante PCR da questi animali. Inoltre da uno studio effettuato da Catelli *et al.* (2001) in Emilia-Romagna è emersa una positività sierologica sia in fagiani d'allevamento che liberi, con una prevalenza più alta nei primi. 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), Shin *et al.* nel 2001 hanno dimostrato la sensibilità di anatre cinesi 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 Toquin *et al.*, nel 2006 (b), 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 osservate anche in struzzi in Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994) ed anche in Italia, da animali importati dall'Africa (Capua *et al.*, 1998a).

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). L'inoculo di AMPV sottotipo C produce sieroconversione in topi e ratti di laboratorio ed è rilevabile in diversi organi mediante PCR (Nagaraja *et al.*, 2001).

Sicuramente dibattuto risulta essere il ruolo degli uccelli selvatici nella diffusione e nel mantenimento dell'infezione. In Germania, un'indagine epidemiologica svolta da Heffels-

Redmann *et al.* (1998) ha permesso di evidenziare, attraverso test di sieroneutralizzazione, positività anticorpali per *AMPV* in gabbiani della specie *Larus argentatus argentatus*. In una ampia 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-Redman *et al.* (1998), sono risultati negativi sia sierologicamente sia alla 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.

L'iniziale diffusione del virus dal Sud Africa verso l'Europa e l'improvvisa comparsa della malattia in Minnesota, paese degli Stati Uniti che possiede una grande popolazione di uccelli migratori (Cook, 2000a) però lascia aperta l'ipotesi che siano gli uccelli selvatici a veicolare il virus per grandi distanze. Shin *et al.* (2000a) hanno dimostrato la presenza di RNA virale sottotipo C e anticorpi nei confronti di *AMPV* in varie specie selvatiche (passeri, rondini, storni, oche) oltre che in anatre usate come sentinelle nei pressi di allevamenti di tacchini, e che le sequenze del gene M dei virus evidenziati ha un elevato grado di omologia con isolati di *AMPV* dal tacchino. Bennet *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 folaga, hanno evidenziato, in aree dove la TRT non è endemica, *AMPV*-C mostranti omologie genetiche con ceppi isolati da tacchini. Tuttavia non è possibile 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).

Negli Stati Uniti l'infezione ha colpito solo i tacchini e non sono stati evidenziati casi di malattia nel pollo in condizioni di campo (Cook, 2000a). È stata comunque dimostrata, sperimentalmente, la sensibilità del pollo ad un'infezione da *AMPV* isolato dal tacchino. Broiler di due settimane, infettati per via oculonasale od orale con un ceppo del tacchino, hanno sviluppato segni clinici e sono risultati positivi alla PCR per *AMPV*. Inoltre, è stato reisolato il virus dagli animali ed è stata rinvenuta la presenza di anticorpi anti-*AMPV* nel siero (Shin *et al.*, 2000b).

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.

2.2. 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). Questo ha fatto ipotizzare che il metapneumovirus potesse essere un patogeno presente già da prima nelle specie aviari selvatiche delle regioni sudafricane (Jones, 1996). Questa ipotesi è supportata dal fatto che, come detto prima, sono state osservate positività sierologiche in sieri di struzzi dello Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994).

Successivamente il virus si è diffuso in maniera estremamente rapida in diverse aree geografiche e, attualmente, è possibile affermare che il virus sia presente ormai quasi in tutto il mondo. Negli anni '80 la malattia è stata segnalata in diversi stati europei quali Francia, dove pare essere comparsa nel 1981, al centro della Bretagna, per poi diffondersi rapidamente a tutta la regione (Giraud *et al.*, 1986), Gran Bretagna, dove l'agente causale è stato caratterizzato (Anonimo, 1985; McDougall e Cook, 1986; Wilding *et al.*, 1986; Wyeth *et al.*, 1986), Spagna (Anonimo, 1985) e Italia (Fabris e D'Aprile, 1990), Germania (Hafez e Woernle, 1989), Ungheria (Lantos, 1990), Austria (Polland *et al.*, 1992), Olanda e Polonia (Minta *et al.*, 1995) e Croazia (Bidin *et al.*, 1990). 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).

In particolare in Inghilterra, il virus è comparso per la prima volta nel giugno del 1985, nella contea di Norfolk sulla Costa Orientale, da cui in soli 6 mesi si è diffuso in gran parte del territorio inglese e in Galles (Anonimo, 1985). Poiché questa regione si trova su una delle principali rotte migratorie, è stato subito ipotizzato che gli uccelli, in grado di compiere lunghi spostamenti in direzione nord sud, giochino un ruolo importante nella trasmissione del virus tra i vari paesi (Stuart, 1989).

L'infezione da AMPV ha fatto la sua comparsa anche in paesi extraeuropei quali Israele (Weisman *et al.*, 1988), Yemen (Sarakbi, 1989), Marocco (Houadfi *et al.*, 1991), Zimbabwe (Cadman *et al.*, 1994), Cina (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), Perù, Argentina, e recentemente Cile (Toro *et al.*, 1998) e Stati Uniti (Senne *et al.*, 1997), Giordania (Gharaibeh e Algharaibeh, 2007), Cina e Nigeria (Owoade *et al.*, 2008). L'unico continente ancora indenne è l'Oceania (Bell e Alexander, 1990).

Negli Stati Uniti d'America la situazione sembra essere abbastanza enigmatica. Fino al 1996, infatti, non è stato segnalato alcun episodio, sebbene l'infezione fosse presente da tempo in America Centrale. A giustificazione di questo fatto è stato ipotizzato che il numero relativamente contenuto della popolazione avicola nei territori al confine col Messico, abbia potuto arginare l'ingresso dell'infezione (Jones, 1996). Nel 1996 fa la sua comparsa in Colorado una malattia respiratoria ad alta contagiosità, da cui viene in seguito isolato AMPV (Senne *et al.*, 1997). Nel giugno dell'anno successivo tale focolaio si estingue, mentre la malattia compare in Minnesota dove è presente tuttora (Shin *et al.*, 2000b). La fonte dell'infezione non è stata ancora determinata e pone non pochi interrogativi.

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.

2.3. SITUAZIONE ITALIANA

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 5). È 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).

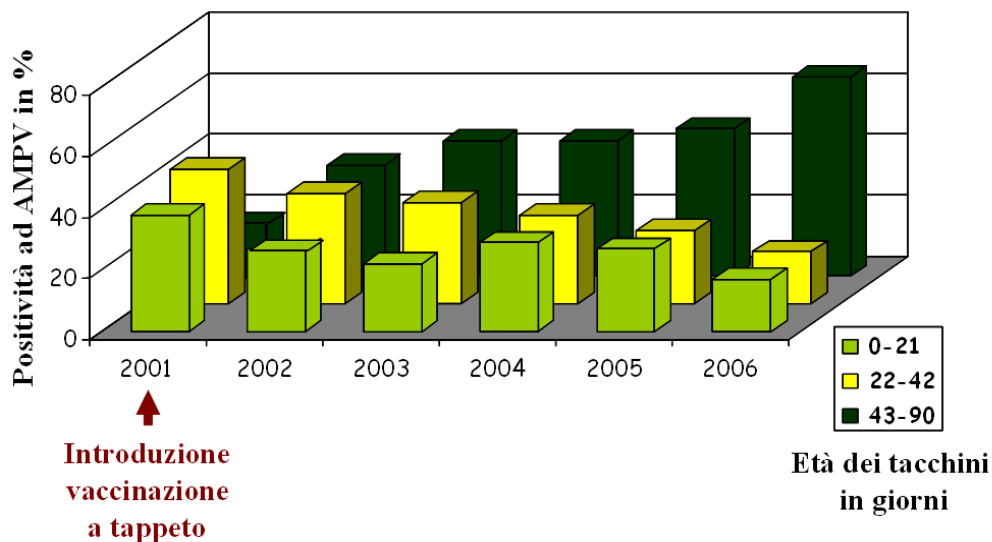


Figura 5: Distribuzione percentuale, per età, dei tacchini positivi ad AMPV (Catelli, 2006).

2.4. MODALITÀ DI TRASMISSIONE

La trasmissione è di tipo orizzontale. Gli animali si infettano infatti inalando il virus e la principale via di eliminazione risulta essere la via aerea. Le feci, al contrario, non sono implicate nella diffusione. Improbabile o comunque di scarso rilievo sembra essere la trasmissione verticale, nonostante sia stata evidenziata la replicazione virale nell'ovidutto (Jones *et al.* 1988; Cook *et al.*, 2000). Inoltre non esistono a tutt'oggi evidenze di una possibile latenza virale (Velayudhan *et al.*, 2005). Il Metapneumovirus risulta essere scarsamente resistente al di fuori dell'ospite, tuttavia si pensa che, in caso di focolaio, possano avere un ruolo epidemiologico numerosi vettori, come ad esempio l'acqua infetta, le attrezzature, il personale, la lettiera e gli autocarri che trasportano mangime e animali (Stuart, 1989; Jones, 2002). Da non dimenticare inoltre il ruolo che avrebbero gli uccelli selvatici.

Alcune ricerche hanno tentato di valutare la capacità di diffusione dell'agente eziologico. 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 sperimentale di verificare questa possibilità è fallito benché il flusso dell'aria fosse favorevole. Questi dati sono stati confermati da Alkhalaf *et al.* (2002).

Questi dati supportano una scarsa o lenta trasmissione sulle lunghe distanze del virus. 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 presenta uno spiccato tropismo per le alte vie respiratorie; a questo livello troviamo infatti le cellule cigliate dell'epitelio dell'apparato respiratorio che sono il primo sito di replicazione virale. La principale via di penetrazione è la via aerogena, attraverso la quale il virus, veicolato da gocce di muco e di saliva di animali infetti, viene a contatto con le cellule target. Vie secondarie sono rappresentate dalla via orale e dalla via oculare: da qui il virus raggiunge l'apparato respiratorio rispettivamente tramite la fessura palatina e le vie lacrimali.

Più precisamente i siti primari di replicazione sono gli epitelii delle cavità nasali, dei turbinati, dei seni infraorbitali e della trachea. Nel tacchino il virus può essere evidenziato in questi tessuti, con immunofluorescenza, fino a 7-9 giorni post-infezione (PI), con il numero massimo di cellule fluorescenti fra la terza e la quinta giornata (Jones *et al.*, 1988). Piccole quantità virali possono essere isolate anche fino al quattordicesimo giorno dall'inoculazione (Cook *et al.*, 1991). Addirittura, mediante l'uso della PCR, si è potuto evidenziare l'RNA di AMPV da tamponi tracheali fino a 17-19 giorni PI (Li *et al.*, 1993). Le tecniche di immunofluorescenza e di immunoperossidasi, su sezioni di organi, hanno inoltre dimostrato che l'antigene si ritrova principalmente associato alle ciglia e, occasionalmente, nel citoplasma delle cellule epiteliali (Majò *et al.*, 1995). Risultati simili a quelli citati precedentemente si sono avuti nel pollo (Catelli *et al.*, 1998), tanto che non sembrano esserci differenze di specie nella patogenesi. Per quel che riguarda i tratti profondi dell'apparato respiratorio, infezioni sperimentali sia in polli che in tacchini, hanno rilevato 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) ed i sacchi aerei (Cook *et al.*, 1993b). Non è chiaro come proceda in seguito l'infezione; isolamenti o comunque evidenze del virus, infatti, sono stati ottenuti più volte da organi differenti da quelli citati precedentemente. Inizialmente AMPV è stato rilevato nell'ovidutto (Jones *et al.*, 1988), tanto che si suppose un possibile contagio direttamente dal sacco aereo di sinistra (via accertata in alcune malattie aviari, come la colibacillosi). Kherha e Jones nel 1999 hanno isolato AMPV dalla ghiandola di Harder e dal rene di tacchini e polli infettati sperimentalmente (Kherha e Jones, 1999b). Lavori più recenti hanno rilevato particelle virali con RT-PCR anche nella milza (Sharma *et al.*, 2004; Aung *et al.*, 2008), nelle tonsille ciecali, nella borsa di Fabrizio (Aung *et al.*, 2008), nel sangue, e, in seguito a infezione sperimentale per via orale, anche dall'intestino (Shin *et al.*, 2000b).

Questi studi fanno supporre che il virus dopo una prima replicazione nelle prime vie respiratorie, dia una breve e transitoria viremia, andandosi poi a localizzare in altri distretti come la milza e l'ovidutto. In particolare sembra che nella disseminazione virale siano implicati i macrofagi: questi verrebbero infettati a livello di apparato respiratorio e veicolerebbero AMPV negli organi periferici (Figura 6) (Sharma *et al.*, 2004). La sensibilità dei macrofagi nei confronti di Metapneumovirus è stata accertata in vitro (Sharma *et al.*, 2004). Alcuni autori hanno inoltre ipotizzato una azione immunosoppressiva del virus (Chary *et al.*, 2002); Chary *et al.* hanno valutato l'effetto dell'esposizione ad AMPV sulla risposta immunitaria di tacchini nei confronti di due vaccini per il virus dell'enterite emorragica (HEV), da cui ne è risultata una mancata protezione in seguito a challenge con ceppo virulento di HEV. Le ricerche hanno evidenziato che, mentre AMPV non sembra dare alterazioni nella produzione di anticorpi, la mitogenesi delle cellule T, nella prima settimana dopo l'inoculo, risulta inibita (Chary *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2004). Ulteriori ricerche comunque dovranno essere effettuate.

Nonostante alcuni studi abbiano osservato differenze nella distribuzione e replicazione virale nei tessuti fra i sottotipi A e B (Van de Zande *et al.*, 1999; Aung *et al.*, 2008), non sembrano esserci rilevanti differenze nella patogenesi, legate a tale aspetto. I differenti risultati sembrano infatti maggiormente legati alla virulenza del singolo ceppo in sé, piuttosto che al diverso sottotipo virale (Aung *et al.*, 2008). Studi sul sottotipo C paiono confermare questa affermazione (Shin *et al.*, 2000b; Nagaraja *et al.*, 2005).

Sono state altresì effettuate prove sperimentali, allo scopo di valutare quale sia l'influenza di altri patogeni respiratori sull'invasività di Metapneumovirus. Jirjis *et al.* (2004) hanno evidenziato come nell'infezione da AMPV in associazione a *Bordetella avium*, nel tacchino, la replicazione

virale nei polmoni sia maggiore rispetto alla sola infezione col virus. Sempre nel tacchino è stato dimostrato che la coinfezione virale con *Mycoplasma gallisepticum* (Naylor *et al.*, 1992) o *Mycoplasma imitans* (Ganapathy *et al.*, 1998) favorisce e accelera la colonizzazione da parte di Metapneumovirus delle porzioni più profonde delle vie respiratorie. Risultati simili sono stati ottenuti da Van Loock *et al.* (2006) con *Chlamydochloa psittaci*. Nel pollo infezioni miste con E.Coli ed AMPV hanno dimostrato un effetto sinergico tra i due agenti che si esplica in una maggiore diffusione, replicazione e persistenza negli organi respiratori sia del virus che del batterio (Majò *et al.*, 1995; Al-Ankari *et al.*, 2001). Al contrario la contemporanea infezione con *Coronavirus* della bronchite infettiva e Metapneumovirus aviare sembra inibire la replicazione di quest'ultimo (Jones *et al.*, 1998).

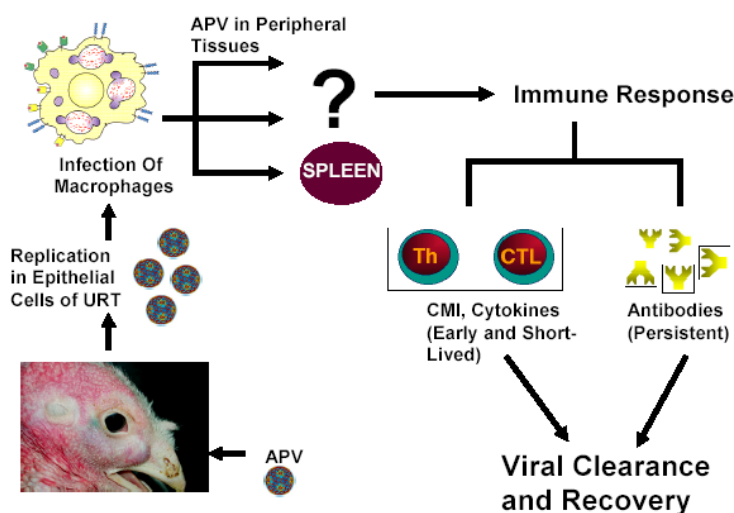


Figura 6: Patogenesi delle infezioni da AMPV nel tacchino (Sharma *et al.*, 2004).

3.1. TROPISMO VIRALE PER L'APPARATO RIPRODUTTORE

Fin dai primi focolai di TRT in animali in deposizione, oltre alla classica sintomatologia respiratoria, si è osservato un peggioramento delle performances riproduttive (O'Brien, 1985; Cook *et al.*, 1988). Tuttavia non ci si spiegava se tale sintomo fosse dovuto a una ripercussione sistemica dell'infezione virale, oppure se il virus agisse direttamente sugli organi della riproduzione.

Jones *et al.* (1988), in seguito a un'infezione sperimentale in tacchine di 30 settimane, dimostrarono che, in questa specie, l'apparato riproduttivo è sede di replicazione virale. Infatti, 9 giorni dopo l'inoculazione, il virus fu isolato dal magnum e dalla vagina, mentre, mediante tecniche di immunofluorescenza (IF), venne evidenziato l'antigene virale nelle cellule epiteliali dell'utero al settimo giorno post-infezione (PI) e in tutte le porzioni dell'ovidutto al nono giorno PI. Nell'ovaio, invece, non si riscontrò nulla.

Ma se nella tacchina l'interrogativo sembra avere trovato una risposta, nella gallina, al contrario, la situazione risulta più complicata. Le prime segnalazioni di AMPV in questa specie sono associate alla Sindrome della Testa Gonfia (SHS), patologia in cui la componente batterica svolge un importante ruolo; in particolare l'*Escherichia coli* è sicuramente il batterio più frequentemente coinvolto. Questo Gram - è causa di numerosi stati morbosi nei volatili, tra cui la Peritonite Ovarica, che include uno svariato numero di alterazioni riproduttive (Wray e Davies, 2002). Si può, quindi, facilmente dedurre come il calo dell'ovodeposizione e le malformazioni a carico delle uova descritte in bibliografia a seguito di episodi di SHS in galline in deposizione siano spiegabili con la sola azione batterica. A supporto di ciò vi sono i numerosi tentativi fallimentari di isolare o comunque evidenziare il virus nell'apparato riproduttivo, dopo infezioni sperimentali per vie naturali con AMPV (Majò *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998). Malgrado tali dati, nel tempo sono aumentati i riscontri in campo riguardo la

capacità del virus di indurre da solo alterazioni nella produzione di uova nelle galline. Cook *et al.* (2000) hanno effettuato studi di patogenicità del virus per l'apparato riproduttivo dei polli usando vari modelli sperimentali. Kherha e Jones (1999a) 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 endovenosa, non è stata dimostrata la presenza del virus nell'ovaio o nell'ovidutto. Cook *et al.* (2000), con uno studio assimilabile a quest'ultimo, hanno osservato in galline infettate sperimentalmente per via endovenosa, un calo dell'ovodeposizione e malformazioni a carico delle uova, nonché, all'esame immunoistochimico (immunoperossidasi), la replicazione del virus nell'epitelio dell'ovidutto. Anche in questo caso però, l'inoculazione per via oculonasale ha dato esito negativo. I risultati di entrambi gli studi portano comunque alla comune conclusione che l'epitelio dell'ovidutto nel pollo sia in sé sensibile all'infezione da AMPV, ma ancora non è chiaro, come quest'ultimo possa raggiungerlo. Un esperimento simile a quello eseguito da Cook *et al.* (2000), è stato ripetuto successivamente da Hess *et al.* (2004) e da Sugiyama *et al.* (2006) con gli stessi risultati.

Pochi studi sono stati effettuati sull'azione del virus sugli organi riproduttivi maschili. Villarreal *et al.* (2007) hanno rilevato AMPV con tecnica PCR in testicoli di galli con problemi di fertilità; tuttavia ulteriori studi saranno necessari per poter comprendere l'esatto ruolo del virus nel maschio. Infine Al-Afaleq *et al.* nel 2002 hanno valutato, *in vitro*, su organocolture di anelli tracheali (TOC), la possibile influenza sulla replicazione virale degli ormoni regolanti la funzione riproduttiva (testosterone, progesterone ed estradiolo), senza però dimostrare alcun nesso.

3.2. INTERAZIONI MOLECOLARE OSPITE-PATOGENO

Munir e Kapur (2003) hanno proposto un modello basato sulle interazioni molecolari tra ospite e patogeno che si verificano durante una infezione sperimentale di cellule embrionali di pollo con AMPV (Figura 7). Questo tipo di interazioni prevedono una complessa interazione tra pathways molecolari diretti dalla cellula per prevenire l'infezione virale e le contromisure da parte del virus per favorire la sua propagazione.

Interferoni

Diversi geni stimolati da interferoni sono fortemente indotti. La loro espressione risulta aumentata nelle prime 2,5 ore post-infezione e continua ad incrementare nelle successive 96 ore. Alfa/Beta citochine sono le famiglie espresse in risposta ad un'infezione virale (Samuel *et al.*, 2001) e costituiscono la prima linea della difesa innata contro le invasioni virali attraverso la stimolazione di geni ISG (interferon stimulated genes), quali proteina antivirale Mx, la PKR (proteina chinasi R attivata da RNA doppio filamento), la 2-5A (2'-5' oligoadenilato sintetasi) ed altri (Guo *et al.*, 2000, Samuel *et al.*, 2001). Il gene della proteina Mx è massicciamente indotto. Questo gruppo di proteine sono GTPasi antivirali, componenti chiave della risposta antivirale mediata da interferoni (Schumacher *et al.*, 1994) ed hanno la capacità di sequestrare i nucleocapsidi virali rendendoli inaccessibili alla replicazione (Kochs *et al.*, 2002). Durante l'infezione da AMPV si osserva una up-regolazione di questo gene ma tuttora si ritiene che abbia un ruolo chiave solo come elemento stimolante della cascata dell'interferone (Munir *et al.*, 2003).

La proteina IFI-56K risulta over-espresa e in costante accumulo durante il progredire dell'infezione. E' nota la sua funzione di arresto nella traslazione dell'RNA agendo sul complesso proteico responsabile di questa fase. Parallelamente una delle sub-unità di questo complesso subisce un incremento nell'espressione dovuto all'azione del virus proponendolo come una delle contromisure attuate dal parassita per eludere le difese innate cellulari (Munir *et al.*, 2003).

Anche i fattori di trascrizione citoplasmatici STAT1, che hanno un ruolo centrale nella via dell'interferone, sono fortemente indotti durante l'infezione.

Da tali studi si è osservato come *AMPV* non blocchi la cascata dell'interferone permettendo l'espressione dei geni IFNGs. La resistenza di *AMPV* all'azione dell'IFN e dei geni da esso attivati deve risiedere in un punto a valle della cascata dei segnali.

Chemochine pro-infiammatorie, complemento e molecole di adesione

Le chemochine sono una superfamiglia di citochine ad azione di richiamo su alcune componenti cellulari del sistema immunitario. Sono implicate anche in stati patologici causati da gravi danni al tessuto indotti dalla risposta immunitaria. Durante l'infezione da *AMPV* risultano indotte 9E3 e K60 che hanno azione chemioattrattiva proprio sulle cellule che si riscontrano nei tessuti infettati: gli eterofili che rappresentano la maggior componente leucocitaria coinvolta nella risposta ad *AMPV*. Questa prova molecolare concorda con le osservazioni istopatologiche degli animali infettati con *AMPV*. Si osservano infatti infiltrazione di cellule infiammatorie, in particolare di eterofili, presenza di essudato ed edema a carico dei tessuti delle prime vie respiratorie (Wang *et al.*, 1998).

Il fattore del complemento è un importante componente di difesa che agisce contro una grande varietà di aggressori. Il fattore C3 viene fortemente indotto dopo infezione da *AMPV*; esso ha la capacità di attirare i leucociti e gioca un ruolo centrale nell'attivazione di questa cascata di segnali cellulari. C3 media la lisi delle cellule infette attraverso un effetto citotossico mediato dai neutrofili (Kaul *et al.*, 1984).

Il recettore dell'ortochinina risulta espresso massicciamente. Questo è l'unico recettore di molecole pro-infiammatorie che sia noto nel pollo, ed è responsabile dei cambiamenti associati con l'infiammazione: vasodilatazione, incremento della permeabilità vasale e il dolore (Schroeder *et al.*, 1997).

Ub-proteasoma

Diversi geni coinvolti nella regolazione di questa via sono indotti da *AMPV*. Ub-proteasoma comprende diversi sistemi proteolitici coinvolti nella regolazione nella maturazione delle proteine (Hochstrasser *et al.*, 1996). Catene di multi ubiquitina vengono aggiunte per marcare quelle proteine che vanno incontro a degradazione ad opera del proteasoma 26S, un complesso multienzimatico ad attività proteolitica. La presenza di questo enzima rimuove la coda di ubiquitina dalle proteine rendendole di fatto immuni alla degradazione (Hochstrasser *et al.*, 1996).

L'aumento dell'espressione di questo gene può essere interpretato come un meccanismo del virus per impedire la degradazione delle sue proteine nascenti, oppure impedire la presentazione dell'antigene mediante MHC da parte della cellula infetta e quindi impedire il riconoscimento da parte dei linfociti T.

Proteine vescicolari e fusione

Virus dotati di envelope maturano uscendo dalla cellula ospite mediante gemmazione. Le proteine virali e del nucleocapside sfruttano gli apparati della cellula per il loro trasporto verso la membrana. Le proteine interessate dall'azione di *AMPV* sono legate ad una serie di diversi fattori: proteine coinvolte nella veicolazione, formazione di vescicole di clatrina, raggiungimento della membrana.

Si ritiene che il processo di gemmazione dei virus sia analogo a quello utilizzato per l'uscita delle vescicole cellulari ed è quindi ovvio che il virus sfrutti questo apparato a suo favore. La capacità da parte del virus è legata alla presenza di una particolare sequenza chiamata dominio L conservata in molti virus RNA tra cui molti *Paramixoviridae*. Secondo il modello corrente questo dominio dovrebbe mediare l'ubiquitinizzazione del GAG virale oppure della proteina M; le proteine così marcate reclutano componenti del complesso delle vescicole per inviare le proteine virali verso il processo finale di gemmazione. Tale dominio è presente nella regione C-terminale della proteina M tra il residuo 197 e 200 ed è conservato tra i sottotipi A, B, C e con il metapneumovirus umano, hRSV e bRSV (Munir *et al.*, 2003).

Il modello prevede che geni indotti da interferone (IFN) e geni che codificano per le proteine pro-infiammatorie sono predominanti nell'espressione delle cellule infette e rappresentano la risposta dell'ospite. Le molecole pro-infiammatorie sono quindi alla base delle lesioni legate all'infezione virale.

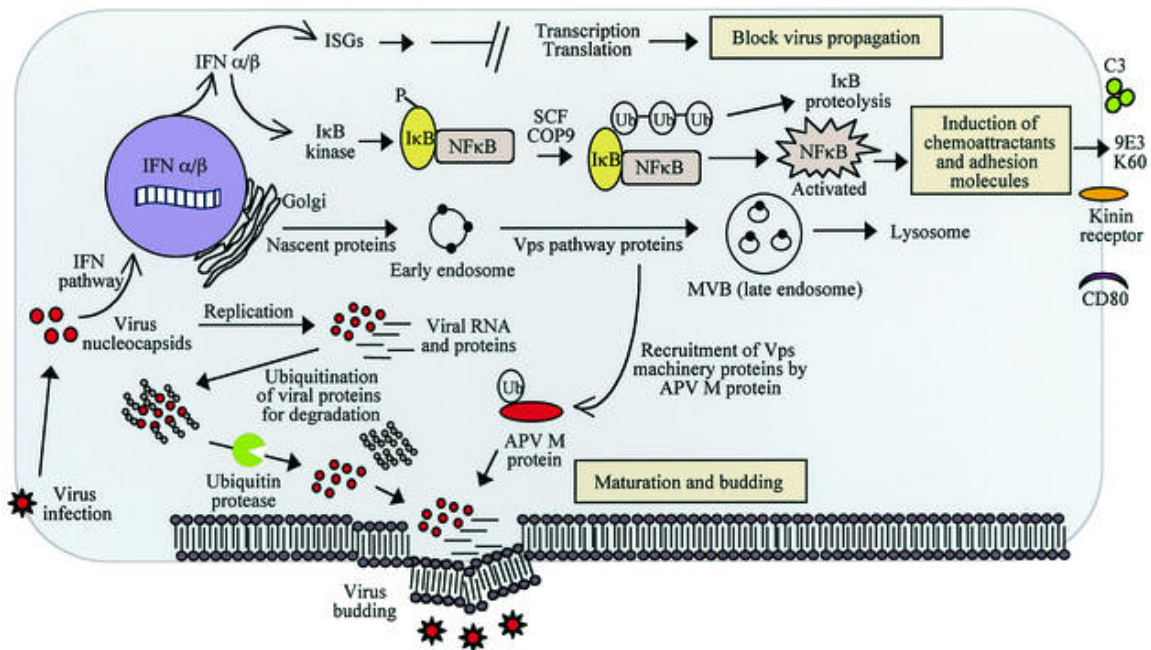


Figura 7: Modello sintetico proposto per rappresentare la patogenesi molecolare nelle cellule infette da AMPV. Nell'ospite si attivano tutte le difese antivirali comprese gli interferoni ed i geni ad essi associati. Viene mostrato anche il meccanismo con il quale AMPV recluta diverse componenti cellulari per consentire la terminazione del processo di replicazione, assemblaggio, e gemmazione fuori dalla cellula (Munir & Kapur, 2003).

4. SINTOMATOLOGIA

4.1. SINTOMATOLOGIA NEL TACCHINO

La rinotracheite del tacchino (TRT) può colpire soggetti di tutte le età, siano essi riproduttori o tacchini da carne. Nel corso di infezioni sperimentali, la sintomatologia clinica è caratterizzata da scolo nasale sieroso che diviene poi mucopurulento e da scolo oculare frequentemente schiumoso (Figura 8). A ciò si associano rigonfiamento dei seni infraorbitali, starnuti, scuotimenti della testa, tosse, rantoli e depressione. In 10-14 giorni l'animale recupera completamente (Jones *et al.*, 1986; McDougall e Cook, 1986; Wyeth *et al.*, 1986; Buys *et al.*, 1989a; Turpin *et al.*, 2002). Benché le condizioni d'allevamento siano importanti nella patogenesi della malattia, è stata osservata una sintomatologia grave anche in tacchini tenuti in isolamento e in condizioni igieniche controllate a dimostrazione del fatto che il tacchino è in sé molto sensibile all'infezione (Naylor e Jones, 1993). In campo comunque la sintomatologia è sempre molto più grave rispetto alle condizioni sperimentali in quanto la malattia è altamente influenzata dalle pratiche manageriali quali ventilazione, igiene e densità degli animali.

Oltre alla sintomatologia respiratoria, in campo si possono osservare nei tacchini in accrescimento un calo dell'incremento ponderale, e nelle femmine una riduzione nella produzione e nella qualità delle uova (Naylor e Jones, 1993). Inoltre, i sintomi respiratori possono presentare, in corso di infezioni complicate, una maggiore gravità ed essere accompagnati da reperti anatomopatologici di aerosacculiti, pericarditi, polmoniti e periepatiti. La sintomatologia compare rapidamente e si propaga all'interno di un capannone nel giro di 12-24 ore. In pochi giorni si estende anche ai capannoni vicini. La morbilità è altissima e si avvicina al 100% (Stuart, 1989). In assenza di complicazioni di origine batterica, il recupero è rapido e i sintomi scompaiono nel giro di 10-14 giorni (Cook, 2000b); in caso contrario, come visto sperimentalmente, persistono per più tempo. La mortalità è estremamente variabile, da quasi nulla può arrivare al 50%. 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.

Nei riproduttori in produzione l'infezione determina una sintomatologia respiratoria molto più leggera ma provoca una sostanziale riduzione della produzione di uova. Si possono registrare perdite del 40% e, nei casi più gravi, si può arrivare a produzioni di appena il 2 % delle quote previste (Naylor e Jones, 1993). Occorrono tre settimane per il completo recupero degli animali e durante questo periodo si può osservare un peggioramento della qualità delle uova con assottigliamento del guscio (Cook, 2000b).



Figura 8: Scolo nasale torbido in un tacchino con TRT. Da notare anche il rigonfiamento del seno infraorbitale (Randall e Reece, 1995).

4.2. SINTOMATOLOGIA NEL POLLO

Il ruolo di AMPV come patogeno nel pollo non è ancora del tutto chiarito benché sia comunemente associato a casi di Sindrome della testa gonfia (SHS) (Figura 9). Lo stesso virus che causa malattia nel tacchino è in grado di infettare il pollo e di indurre una specifica risposta anticorpale (Jones *et al.*, 1987; Cook *et al.*, 1993b; Majò *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998). Il virus è stato comunque isolato dal campo in 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 pneumovirus si sviluppa una sintomatologia clinica molto lieve, caratterizzata da uno scolo nasale più o meno abbondante o torbido che scompare nel giro di dieci giorni (Majò *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998). Quadri più gravi di malattia caratterizzati da letargia, scolo nasale mucopurulento e congestione congiuntivale, sono invece stati osservati nel corso di infezioni sperimentali miste con AMPV ed E. coli, anche se non è stato possibile ricreare la Sindrome della testa gonfia (Majò *et al.*, 1997; Nakamura, 1998; Al-Ankary *et al.*, 2001).

In campo il virus è in grado di infettare soggetti di tutte le età, broiler, riproduttori e femmine in ovodeposizione. Nei broiler, AMPV potrebbe non essere un patogeno primario ma essere coinvolto insieme ad altri agenti nella sindrome della testa gonfia o in altre malattie respiratorie. Nei riproduttori, invece, esistono prove valide che conferiscono al virus un ruolo primario nella SHS (Cook, 2000a). Infine, nelle galline ovaiole, l'infezione si può associare a un calo della produzione. Nei broiler, la SHS ha la massima incidenza a 4 e 6 settimane d'età (Morley e Thomson, 1984) mentre nei riproduttori colpisce soprattutto i soggetti al picco di produzione, tra le 30 e le 52 settimane d'età (O'Brien, 1985; Pattison, 1989). La morbilità può raggiungere il 10%, mentre la mortalità raramente supera il 2% anche se, in condizioni ambientali particolarmente sfavorevoli, può toccare valori del 20-30%. I sintomi clinici hanno una durata di circa 2-3 settimane e sono inizialmente caratterizzati da depressione e diminuzione del consumo di alimento, accompagnati da starnuti, scolo nasale e oculare. In un secondo tempo, solo in una bassa percentuale di soggetti che hanno manifestato tale sintomatologia, si sviluppa un edema periorbitale che può anche estendersi a tutta la testa, tipico della Sindrome della testa gonfia.



Figura 9: Pollo affetto da Sindrome della Testa Gonfia (Arch. Fot. Patologia aviare, Università di Bologna).

4.3. LA MALATTIA NEGLI ANIMALI IN DEPOSIZIONE

In tali categorie di animali si osservano sintomi respiratori solitamente 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 ovaioia, 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; Drouin *et al.*, 1985, Picault, 1988), oltre a malformazione a carico delle uova (Drouin *et al.*, 1985). Anche in questa specie la fertilità e schiudibilità delle restanti uova rimane nella norma (Perelman *et al.*, 1988). 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; Sugiyama *et al.*, 2006). 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 in seguito al challenge dall'85.7% al 56.2%. Sugiyama *et al.* (2006) riportano che il reperimento massimo di uova malformate si concentra nei periodi prima del calo produttivo e durante la convalescenza.

Nei riproduttori, inoltre, si osservano sintomi di natura nervosa con disorientamento, torcicollo e opistotono. Nei casi più gravi si arriva alla totale incapacità di movimento associata ad un grave stato di prostrazione e al completo rifiuto di acqua e cibo che conduce alla morte (Hafez, 1992).

5. LESIONI ANATOMO-ISTOPATOLOGICHE

5.1. LESIONI ANATOMO-PATOLOGICHE

Nei tacchini infettati sperimentalmente con AMPV si osserva, tra il primo e il nono giorno post infezione, la presenza di un essudato a livello di turbinati dapprima chiaro e sieroso, poi grigiastro e mucoso; mentre tra il primo e il settimo giorno post infezione si evidenzia in trachea un eccesso di muco (Jones *et al.*, 1988). Nelle infezioni miste si nota un aggravamento del quadro necroscopico per la presenza di aerosacculite, pericardite, polmonite e periepatite (Stuart, 1989; Naylor *et al.*, 1992; Van de Zande, 2001; Jirjis *et al.*, 2004). Sperimentalmente nelle femmine in ovodeposizione, oltre alle lesioni respiratorie, sono state evidenziate anche diverse alterazioni a carico dell'apparato riproduttivo quali peritoniti ovariche, lesioni di carattere regressivo all'ovaio, con diminuzione numerica dei follicoli, e degenerazioni a carico dell'ovidutto. Si può trovare anche del materiale vitellino libero in addome (Jones *et al.*, 1991).

Nei polli inoculati solo con AMPV non si ha la comparsa di lesioni significative ma solo di una modesta rinite. Al contrario, a seguito dell'infezione contemporanea con E. coli e il pneumovirus aviare (Majò *et al.*, 1997; Nakamura, 1998; Al-Ankari *et al.*, 2001) si manifesta una rinite grave, con muco denso in cavità nasale e nei seni infraorbitali. Majò *et al.* (1997) hanno altresì osservato la presenza, in pochi animali, di edema periorbitale unilaterale, aerosacculite fibrinosa, pericardite fibrinosa e materiale mucopurulento negli spazi aerei delle ossa del cranio; mentre nello studio di Al-Ankari *et al.* (2001), in un animale è stato evidenziato edema sottocutaneo alla base della testa e congestione del cervello. Benché anche queste ricerche abbiano fallito nel tentativo di ricreare sperimentalmente un quadro di SHS, simili lesioni sono state descritte in casi di malattia clinica ed associate all'isolamento di E coli (Morley e Thomson, 1984; Pattison *et al.*, 1989; Nunoya *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997). Infatti, Nakamura *et al.* (1997), hanno osservato in broilers affetti da Sindrome della testa gonfia un marcato gonfiore del tessuto sottocutaneo periorbitale e talvolta anche di quello sottomandibolare che, al taglio, è apparso edematoso e, occasionalmente, accompagnato da materiale caseoso. In due animali questa alterazione è stata notata anche nella camera anteriore degli occhi, mentre altri due polli presentavano quadri di pericardite e periepatite.

5.2. LESIONI ISTO-PATOLOGICHE

Infezioni sperimentali hanno dimostrato che le lesioni istologiche più gravi interessano i turbinati, mentre i danni tissutali a carico dei seni infraorbitali e della trachea risultano meno costanti, tanto che Majò *et al.* (1995) considerano i primi un marker appropriato per la valutazione di un'infezione da AMPV. Si è inoltre dedotto che lesioni descritte nei tacchini non mostrano differenze sostanziali con quelle descritte nei polli.

A carico dei turbinati, al primo e secondo giorno post infezione, si osserva una rinite sierosa con incremento dell'attività ghiandolare, esfoliazione dell'epitelio, perdita delle ciglia a focolaio, iperemia e lieve infiltrazione leucocitaria di cellule mononucleate nella lamina propria. Al terzo e quinto giorno post infezione l'infiammazione assume un carattere mucopurulento con abbondante essudato costituito da eterofili, muco, eritrociti e cellule epiteliali desquamate. L'infiltrazione dei monociti e l'iperemia della lamina propria si aggravano e si evidenziano vaste aree di disepitelizzazione della mucosa. Al sesto, ottavo, e decimo giorno post infezione si evidenziano lesioni molto avanzate, con presenza di muco e cellule epiteliali nel lume, iperplasia dell'epitelio, iperemia e leggera infiltrazione di mononucleati nella sottomucosa (Majò *et al.*, 1995).

Le lesioni istologiche a carico della trachea consistono in una grave tracheite con presenza di essudato nel lume (Majò *et al.*, 1995), perdita delle ciglia, prima limitata a piccole aree e poi molto estesa, disepitelizzazione e infiltrazione della lamina propria da parte di eterofili e linfociti (Jones *et al.*, 1986). Studi effettuati nel pollo hanno evidenziato che, trascorsi 18

giorni dall'infezione, si ha la completa riparazione dei tessuti (Catelli *et al.*, 1998).

Nel pollo, oltre a queste lesioni, Catelli *et al.* (1998) hanno osservato danni anche a livello dei seni infraorbitali con iperplasia e desquamazione a focolai dell'epitelio cigliato, congestione, edema, emorragie e infiltrazione di mononucleati nella lamina propria, e presenza di essudato mucoso nel lume. Anche Nakamura *et al.* (1997) hanno osservato tale quadro in soggetti affetti da SHS. Ciò suggerisce che le lesioni causate dall'AMPV a questo livello permettano a *E. coli* di invadere il tessuto sottocutaneo e di causare le lesioni tipiche della malattia (Nakamura *et al.*, 1997).

Benché non sia ancora stato possibile riprodurre sperimentalmente la Sindrome della testa gonfia, in polli che hanno subito un'infezione mista con AMPV ed *E. coli* si osservano lesioni gravi riconducibili ad una fase iniziale di SHS, caratterizzate da infiltrazione eterofila nella mucosa olfattiva dei turbinati caudali e nel lume della porzione caudale dei seni infraorbitali, che si estende agli spazi aerei delle ossa del cranio e al tessuto connettivo periorbitale. Poiché i seni infraorbitali sono in diretta comunicazione con le cavità nasali e caudalmente con le ossa del cranio, è probabile che il materiale purulento derivi da una reazione infiammatoria associata alla presenza di *E. coli* nelle cavità nasali (Majò *et al.*, 1997). A conferma di ciò, in casi clinici di SHS sono state osservate lesioni alla testa che si potrebbero ricondurre ad un'evoluzione di questa forma iniziale con estensione del processo infiammatorio dagli spazi aerei ai tessuti circostanti con conseguente periostite e cellulite. Sono stati infatti messi in evidenza infiammazione fibrinopurulenta, edema e lesioni granulomatose a carico del tessuto sottocutaneo facciale, infiammazione del tessuto connettivo palpebrale e degli spazi aerei delle ossa del cranio, otite media con marcata essudazione di eterofili e fibrina nell'orecchio medio e meningite (Nakamura *et al.*, 1997).

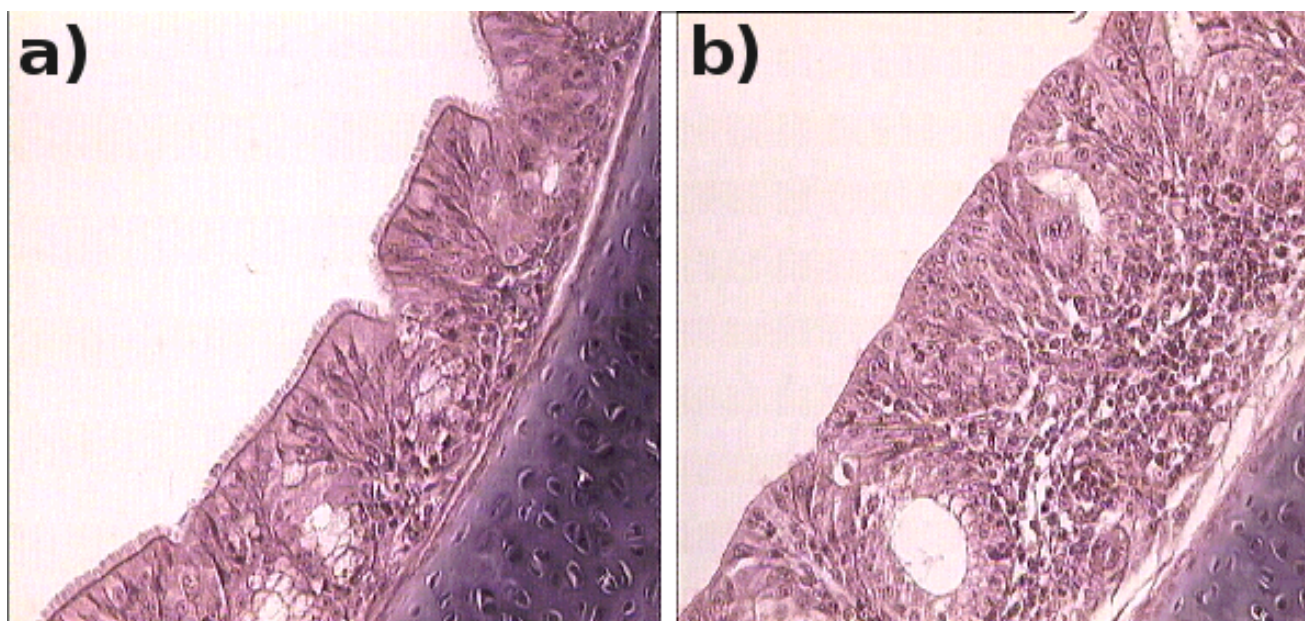


Figura 10: **a)** Sezione istologica di turbinato nasale di tacchino in condizioni normali(Arch. Fot. Patologia aviare, Università di Bologna). **b)** Turbinato nasale di tacchino infettato con AMPV. Si notano deciliazione ed infiltrazione infiammatoria. (Arch. Fot. Pat. Aviare).

6. RISPOSTA IMMUNITARIA

Come per la maggior parte delle malattie virali respiratorie, l'immunità locale gioca un ruolo fondamentale nel prevenire l'infezione delle prime vie respiratorie, con la produzione di Ig-A ed Ig-G neutralizzanti che compaiono in poco tempo raggiungendo alti livelli anche nella lacrima. Gli anticorpi umorali intervengono tardivamente (circa 10 giorni dopo l'infezione), e non sono strettamente correlati con l'effettiva protezione dell'apparato respiratorio. E' probabile, tuttavia, che un alto livello di questi anticorpi difenda l'apparato riproduttore prevenendo così i cali di ovideposizione. L'immunità materna non è in grado di prevenire l'infezione come osservato sperimentalmente (Naylor *et al.*, 1997b). La stimolazione dell'immunità cellulo-mediata può prevenire l'infezione favorendo il superamento della malattia. Infatti pulcini bursectomizzati, resi incapaci di produrre anticorpi, una volta vaccinati hanno mostrato resistenza all'infezione (Jones *et al.*, 1992).

E' stato osservato inoltre come vaccini vivi attenuati stimolino sia l'immunità locale che quella sistemica. L'incremento, per quanto variabile, di cellule CD4+, evidenzia come questa componente immunitaria possa avere un ruolo più importante nella protezione da infezioni da AMPV di quanto non siano le cellule CD8+ citotossiche (Liman *et al.*, 2004). Recentemente Rubbenstroth *et al.* (2009) hanno confermato, nel tacchino, il ruolo primario nella protezione da AMPV da parte dei linfociti T.

Mediante infezioni miste è stato dimostrato che alcuni agenti possono indurre un calo della risposta anticorpale nei confronti di AMPV. Questi patogeni sono rappresentati in primo luogo dal virus della bronchite infettiva (IBV), che oltre ad inibire la replicazione del Pneumovirus provoca un significativo abbassamento del titolo anticorpale, in particolar modo se IBV è somministrato contemporaneamente o 48 ore prima rispetto ad AMPV (Jones *et al.*, 1998), e anche dal virus della pseudopeste (NDV) che sembra avere un'azione analoga all'IBV. Ganapathy *et al.*, (2004) studiando gli effetti della somministrazione contemporanea di un vaccino AMPV e di uno NDV hanno osservato, in paragone con un gruppo vaccinato solamente con vaccino per AMPV, un calo dell'immunità umorale ma nessuna differenza nel livello delle Ig-A presenti nel fluido lacrimale.

7. DIAGNOSI

7.1. DIAGNOSI CLINICA E ANATOMOPATOLOGICA

Né la sintomatologia clinica né la necropsia 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 aviario sia nel tacchino che nel pollo.

7.2. DIAGNOSI DIRETTA

7.2.1. 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.

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 (Juhasz 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 PI. 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).

7.2.2. MICROSCOPIA ELETTRONICA

E' indubbiamente un mezzo di indagine conoscitiva dal momento che permette la caratterizzazione visiva di un agente patogeno di natura virale laddove sia per la prima volta osservato. Viene talvolta utilizzata per conferma dell'avvenuto isolamento di AMPV. Dopo la crescita su differenti substrati il virus si presenta come altamente pleomorfico, da sferico a filamentoso, con diametro variabile da 50 nm a 200 nm per la forma sferica oppure una lunghezza di fino a 1000 nm per la variabile filamentosa (Jones *et al.*, 1996). E' evidente la presenza del nucleocapside a forma elicoidale di 14 nm di lunghezza e 7 nm di larghezza. Dalla superficie protrudono spikes di natura glicoproteica strettamente impaccate di lunghezza intorno a 15 nm.

7.2.3. IMMUNOFLUORESCENZA ED IMMUNOPERROSSIDASI

Le metodiche di immunofluorescenza diretta o indiretta (Baxter-Jones, 1986) sono state utilizzate su sezioni di trachea (Figura 11) 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 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.

7.2.4. IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE

LA *Reverse-transcription PCR* (RT-PCR) è il metodo più veloce e sensibile per l'identificazione di AMPV. Ad oggi sono disponibili diversi protocolli sono basati sull'amplificazione di regioni dei geni F, M, N e G; comunque, a causa della grande eterogeneità genetica tra i vari sottotipi, vari protocolli risultano essere sottotipo specifici o in grado di individuare solo alcuni sottotipi (Bayon-Abouyer *et al.*, 1999; Cook e Cavanagh, 2002; Mase *et al.*, 1996; Naylor *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2001). Primers diretti all'amplificazione di una regione altamente conservata del gene N, hanno mostrato una ampia specificità, amplificando la medesima regione in ogni sottotipo AMPV noto.

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. Ad esempio un protocollo in grado di distinguere AMPV sottotipo A dal B è stato impiegato in studi di tipo epidemiologico per valutare la distribuzione geografica dei diversi sottotipi (Naylor *et al.*, 1997a; Hess *et al.*, 2000; Hafez *et al.*, 2000; Catelli *et al.*, 2004a). 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 (Ali e Reynolds, 1999) 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 *Mbo*II, 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), e ancora AMPV-C, NDV e IBV (Ghorashi *et al.*, 2007).

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 (Hess e Hackl, 2005 ; Guionie *et al.*, 2007).

7.3. DIAGNOSI INDIRETTA

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 riferimento (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).

La sieroneutralizzazione identifica gli anticorpi sierici basandosi sull'inibizione della replicazione del virus su differenti substrati quali le organocolture di anelli tracheali di embrione di pollo o colture cellulari quali CEL, CEF, VERO. In presenza di anticorpi non si evidenziano le caratteristiche alterazioni tissutali virus-indotte quali la cigliostasi su TOC o l'effetto citopatico su colture cellulari. 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 kit ELISA basati su sistema blocking o competitivo.

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 AMPV per svariati motivi tra cui la facilità di sintesi della proteina e il relativo basso costo di produzione, l'alta riproducibilità del test. Numerosi studi sono stati fatti a questo proposito (Gulati *et al.*, 2001; Lwamba *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005). Lwamba *et al.* (2002) hanno messo a punto due ELISA che presentavano rispettivamente M e N come antigeni e li hanno testati con sieri specifici anti A, B e C; mentre M cross reagiva con tutti e 3 i sieri, N dava reazione solo con gli anticorpi anti C. Alvarez *et al.* (2004) hanno sviluppato una 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. Luo *et al.* (2005) hanno testato una Elisa sottotipo C specifica utilizzando la proteina SH. Altri studi sono stati fatti per tentare di migliorare la sensibilità dei comuni test, utilizzando

non più la proteina virale intera, ma parti di essa. Brown *et al.* (2009) hanno diviso in sei regioni la proteina F al fine di valutare l'antigenicità di ciascun frammento con metodo Elisa; tuttavia ulteriori ricerche saranno necessarie.

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

8.1. TERAPIA

Non esiste un trattamento specifico per le infezioni da AMPV. Sicuramente risulta utile la terapia antibiotica per controllare le infezioni secondarie, anche se ne va valutato l'impatto economico; fra i principi attivi maggiormente usati ricordiamo l'enrofloxacin (Hafez *et al.*, 1990), la clortetraciclina, i sulfamidici e i fluorochinoloni (Clark, 1998).

Recentemente sono state sperimentate in vitro sostanze con possibile azione antivirale. Lupini *et al.* (2009) hanno valutato l'azione di estratti di legno castagno, contenenti alti valori di tannini idrolizzabili, sulla replicazione di Metapneumovirus aviari, mostrando un'incoraggiante inibizione virale con scarsa tossicità per il substrato cellulare utilizzato nel test. Munir *et al.* (2007) Hanno proposto un sistema di "RNA interference" per l'inibizione della sintesi della fosfoproteina (P), mentre Ferreira *et al.* (2007) la nucleoproteina (N) e la proteina di fusione (F) ottenendo buoni risultati.

8.2. PROFILASSI INDIRETTA

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.*, 1996; Cook *et al.*, 2000b; Hess *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2006).

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 (Lin *et al.*, 2007; Malo *et al.*, 2007; Tarpey e Huggins; 2007). Inoltre nel pollo il rialzo anticorpale dopo vaccinazione a 1 giorno di vita si ha a 8 giorni di vita contro i 5 della somministrazione in ovo (Malo *et al.*, 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). Anche Tarpey *et al.* (2007) hanno osservato che la simultanea somministrazione di vaccini vivi di AMPV, IBV e NDV non alterino la protezione immunitaria, nonostante il livello anticorpale per AMPV sia inferiore; in seguito a challenge, infatti, la protezione contro tali patogeni si è dimostrata efficace. Ad ogni modo, le ditte produttrici raccomandano di non praticare vaccinazioni per AMPV in concomitanza alla somministrazione di vaccini vivi attenuati per IBV ed NDV, prescrivendo di lasciare trascorrere almeno una settimana tra una somministrazione e l'altra (dati Merial e dati Intervet). Nel tacchino l'unico studio riportato sulla interferenza vaccinale è relativo alla somministrazione contemporanea di vaccini AMPV ed NDV in ovo. L'esito di una successiva infezione sperimentale con ceppo virulento mostra come non ci siano stati effetti negativi sulla efficacia della vaccinazione per AMPV (Worthington *et al.*, 2003).

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.*, 1999b). 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 *et al.*, 2003; Patnayak e Goyal, 2004; Patnayak e Goyal, 2006).

Sono stati sperimentati anche vaccini vivi naturalmente attenuati basati su isolati virali che si sono dimostrati apatogeni. Bennett *et al.* (2005) hanno inculato in tacchini un ceppo isolato da un'oca canadese che ha dato infezione ma non sintomatologia; 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 un ceppo anatra isolato in Francia (Toquin *et al.*, 1999a), si è dimostrato apatogeno per i tacchini e potrebbe essere oggetto di studi futuri per tale fine (Toquin *et al.*, 2006).

Dal momento che il Metapneumovirus aviare è un virus a RNA è alta la possibilità che i ceppi virali attenuati, utilizzati come vaccino, vadano incontro ad una inversione di virulenza (Jones, 1996). In condizioni sperimentali è stata dimostrata la reversione a virulenza di un vaccino vivo attenuato sottotipo A; sono stati sufficienti 4-10 retropassaggi per permettere al virus di riacquisire la virulenza e provocare la malattia (Naylor e Jones, 1994). Catelli *et al.* (2006) hanno dimostrato la reversione a virulenza di un vaccino sottotipo A in allevamenti italiani. Il confronto delle sequenze fra il ceppo vaccinale e il ceppo isolato successivamente in campo, in corso di focolaio di TRT ha mostrato ben nove sostituzioni. Tale virus inoculato in tacchini di un giorno, ha determinato lo sviluppo di segni clinici tipici della 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.

Un approccio per ovviare il problema della perdita di attenuazione è la messa a punto di vaccini stabili ottenuti mediante tecniche di biologia molecolare. Qingzhong *et al.* (1994) hanno ottenuto un vaccino inserendo il gene della proteina F sul virus del vaiolo aviare. Tarpey *et al.* (2001) hanno sviluppato un vaccino plasmidico basato sempre sul gene F del sottotipo C ed hanno valutato l'efficacia della 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; 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 esprime il gene F o N, ottenendo solo con il gene F una protezione significativa dopo challenge con AMPV, con limitata escrezione virale e assenza di segni clinici; 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.* (2004a, 2004b) hanno messo a punto un sistema di reverse genetics che permette di modificare il genoma del Metapneumovirus aviare introducendo mutazioni in punti specifici, o eseguendo delezioni o inserzione 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.

8.3. POSSIBILE ERADICAZIONE

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). Infine le metodiche di allevamento caratterizzate da alta densità di animali in spazi e aree ristrette, nonché il rapido turnover degli stessi sono fattori che complicano il possibile raggiungimento di tale obiettivo (Bennejean, 1990).

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

A. REVERSIONE A VIRULENZA DI UN VACCINO VIVO ATTENUATO AMPV SOTTOTIPO B

A.1. INTRODUZIONE

Per la profilassi della TRT, sin dall'inizio degli anni '90, sono presenti in commercio diversi vaccini vivi attenuati; 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 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 di routine nei tacchini da carne e nei riproduttori, in forma spray ad un giorno di vita, in incubatoio. 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. Nonostante siano diminuite complessivamente negli anni, le positività per AMPV si osservano ancora: da un lato focolai precoci (fino a 42 giorni di età); dall'altro focolai in età avanzata (43-90 giorni di età), anche in animali vaccinati correttamente e con vaccino del medesimo sottotipo.

La presenza dei focolai in età precoce può essere legata alla possibilità che il vaccino vivo attenuato vada incontro a fenomeni di riacquisizione della patogenicità. Testati in condizioni sperimentali tali vaccini vivi attenuati conferiscono buona protezione; tuttavia non danno gli stessi risultati in condizioni di campo. In condizioni sperimentali sono stati sufficienti 4-10 retropassaggi per permettere al virus di riacquisire la capacità di provocare la malattia (Naylor e Jones, 1994). Si può ipotizzare che quando in campo la vaccinazione non viene praticata in maniera efficiente, il virus eliminato dai vaccinati possa passare ai non vaccinati e questo possa ripetersi sin tanto che vi siano soggetti sensibili nel gruppo. A riguardo Catelli *et al.* (2006) hanno isolato, da un focolaio precoce di malattia, un AMPV sottotipo A di origine vaccinale e del quale è stata successivamente dimostrata, in condizioni sperimentali, la capacità di produrre sintomatologia riferibile a TRT.

Catelli *et al.* (2010) hanno condotto due studi longitudinali in due allevamenti di tacchini da carne collocati in una zona ad elevata concentrazione di allevamenti avicoli. Le strutture oggetto di studio distavano tra loro circa 100 km. Tutti i gruppi provenivano dallo stesso incubatoio dove erano stati vaccinati per AMPV ad un giorno di vita, con un vaccino vivo attenuato sottotipo B, con somministrazione spray, anche se gli animali appartenevano a due diverse schiuse. In entrambe gli studi longitudinali si evidenziavano positività alla PCR per AMPV a partire dalla seconda settimana di vita che perduravano sino alla quarta durante la quale è stato isolato un ceppo sottotipo B in entrambe gli allevamenti. Nello studio di Catelli *et al.* (2010) l'analisi filogenetica condotta sui geni G ed F metteva in evidenza una elevata omologia tra questi isolati precoci ed il vaccino sottotipo B somministrato agli animali.

Sulla base di queste evidenze, è stato condotto uno studio per approfondire l'origine degli isolati AMPV B precoci e valutare la possibile riacquisizione di patogenicità, in condizioni di campo, del vaccino sottotipo B. A tale scopo l'analisi filogenetica dei geni G ed F degli isolati, già in parte riportata da Catelli *et al.* (2010) è stata estesa includendo altri ceppi AMPV sottotipo B, isolati in Europa a partire dal 1986, per determinare se gli isolati in esame appartenessero a cluster filogenetici comprendenti il vaccino B. Successivamente, data l'elevata similitudine nei geni esaminati fra gli isolati ed il ceppo vaccinale usato, si è sequenziato l'intero genoma degli stessi e confrontato con il vaccino e ceppi italiani di riferimento. Infine per determinarne la effettiva virulenza, uno degli isolati in esame è stato inoculato in condizioni sperimentali in tacchini sensibili.

A.2. MATERIALI E METODI

A.2.1.1. Analisi filogenetica

Le sequenze dei geni G ed F dei ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04 e il vaccino sottotipo B, riportate da Catelli *et al.* (2010) sono state paragonate con alcune sequenze analoghe, precedentemente studiate da Cecchinato *et al.* (2009) o disponibili in gene bank, ottenute da ceppi AMPV sottotipo B isolati tra il 1987 e il 2007 in diversi paesi europei (Tabella A.1).

L'allineamento è stato eseguito con Clustal W (Larkin *et al.* 2007). L'analisi filogenetica è stata eseguita con l'approccio di *maximum likelihood* (ML). I parametri ML sono stati stimati utilizzando il software TREEPUZZLE versione 5.2 (Schmidt *et al.*, 2002). Mediante PHYLIP 3.67 (Felstein, 1989) sono stati costruiti alberi Neighbour-joining, utilizzando i parametri ML precedentemente stimati ed utilizzando il modello evolutivo HKY85 per la sequenza nucleotidica. L'attendibilità degli alberi filogenetici è stata valutata effettuando un test di bootstrap con 1000 replicati (Felstein, 1985).

Tabella A.1: Ceppi AMPV sottotipo B utilizzati nell'analisi filogenetica basata sui geni G ed F. Sono indicate le referenze dei ceppi o il numero di accesso genbank.

Ceppo AMPV	Referenza
Vaccino sottotipo B ^s	Etteradossi <i>et al.</i> , 1995
Hungary 657/4/89	Y14290
Hungary/97	Y14291
Italy/182/88	Y14292
France 38/86	Y14293
UK/8/94	Y1429
Hungary 657/4/89	L3403
Italy 2119	L34031
Spain 872S	L34034
Israel 1708/02	AY728268
Neth 8726/90	Cecchinato <i>et al.</i> , 2009
France 147	Cecchinato <i>et al.</i> , 2009
UK/8/94	Cecchinato <i>et al.</i> , 2009
UK/11/94	Cecchinato <i>et al.</i> , 2009
Italy 16/91	Cecchinato <i>et al.</i> , 2009
IT/Ty/Vr240/87	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ty/2a/01	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ck/33a/02	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ck/34a/02	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ty/129-18/04	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ty/205-16/04	Catelli <i>et al.</i> , 2010
IT/Ck/1348-01/07	Catelli <i>et al.</i> , 2010

A.2.1.2. Caratterizzazione molecolare dei ceppi AMPV di origine vaccinale

A.2.1.2.1. Ceppi virali

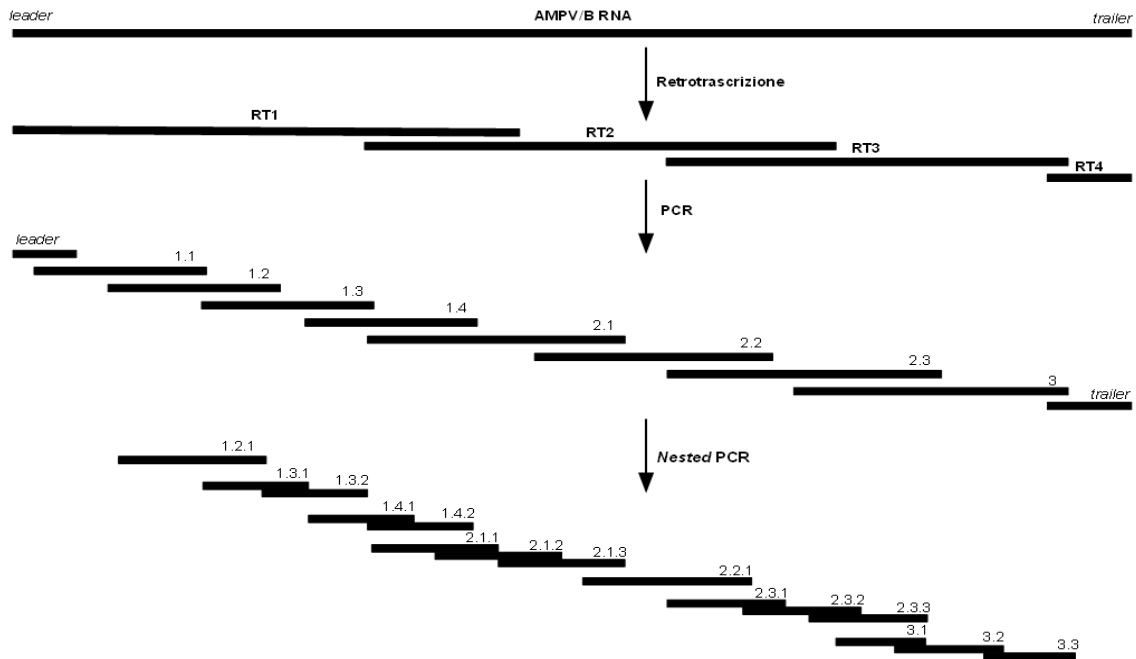
Nello studio sono stati presi in esame i ceppi virali AMPV IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04, isolati durante gli studi longitudinali descritti da Catelli *et al.* (2010) da tacchini maschi di 4 settimane di vita, vaccinati per AMPV in incubatoio con un vaccino vivo attenuato sottotipo B. I ceppi erano stati isolati su organo colture di anelli tracheali di embrioni di pollo (TOC) (Catelli *et al.* 1998) ed avevano subito due passaggi su questo substrato. Gli isolati sono stati utilizzati a titolo virale $10^{4.3}$ CD₅₀ per ml, calcolato come descritto successivamente (paragrafo A.2.1.5.1).

A.2.1.2.2. Analisi della sequenza completa dei genomi di IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04

L'analisi è stata condotta sulla sequenza del genoma completo degli isolati. Prima è stato disegnato un protocollo che permettesse di ottenere la sequenza completa del genoma degli isolati. In seguito tali sequenze sono state confrontate con quelle del vaccino B e di ceppi italiani di riferimento (da Catelli *et al.*, 2010). Il confronto diretto dei genomi ha permesso di descrivere ulteriormente i gradi di analogia andando a confrontare: la sequenza nucleotidica, la lunghezza del genoma e delle sue parti quali le regioni non tradotte e gli *open reading frame* (ORF).

A.2.1.2.3. Protocollo per l'amplificazione del genoma

A tale scopo è stato disegnato un protocollo che permette di ottenere la sequenza completa del genoma di AMPV sottotipo B basato sull'amplificazione, mediante PCR, di del genoma in tratti. Le PCR ottenute presentavano ampie regioni di sovrapposizione (Figura A.1). I *primer* sono stati disegnati a partire da sequenze parziali di AMPV sottotipo B, dal paragone con sequenze di tratti analoghi di AMPV sottotipo A e C o del *virus respiratorio sinciziale* (famiglia *pneumovirinae*), disponibili in letteratura. Le sequenze dei primer sono disponibili su richiesta. Per ridurre l'evenienza di mutazioni casuali dovute a passaggi su substrati di isolamento è stato utilizzato il secondo passaggio su TOC.. Questo permetteva di avere un adeguato titolo virale di partenza e, dato il ridotto numero di passaggi, limitare al massimo l'evenienza di mutazioni nel genoma dovute al passaggio del virus su un substrato permissivo. Un altro accorgimento è stato quello di utilizzare DNA polimerasi *proof-reading* e un ridotto numero di PCR consecutive e della dimensione ottimale di 2Kb. La *nested* PCR è stata utilizzata solo nell'evenienza nella quale non vi fosse materiale sufficiente o quando la presenza di bande aspecifiche avrebbero potuto inficiato il corretto sequenziamento degli ampliconi.



Figura

A.1: Schema dell'amplificazione dell'intero genoma di AMPV. Dall'RNA estratto, mediante 4 retro-trascrizioni, sono state ottenute copie in DNA overlapping. Da queste sono state ottenuti 10 amplificati utilizzati per il sequenziamento. In presenza di bande aspecifiche o di non sufficiente prodotto i frammenti della PCR venivano amplificati secondo lo schema della *nested* PCR. Ogni frammento è chiamato col numero corrispettivo indicato nel protocollo.

A.2.1.2.3.1. 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.

A.2.1.2.3.1.1. 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, $\geq 99\%$, Sigma[®]);
- 7.04 ml di citrato di sodio 0.75 M (Citric acid, Sigma[®]) (ph 7);
- 10.5 ml di N-Lauroylsarcosine al 10% (N-Lauroylsarcosine, 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-mercaptetanolo (2-mercaptoethanol, β-mercaptoetanolo 98%, SIGMA[®]) ad ogni ml di *Stock solution*.

A.2.1.2.3.1.2. Estrazione

Per la processazione di un campione costituito da terreno di coltura di TOC su quale era stato eseguito l'isolamento:

- si versavano 1 ml di *Solution D* in una provetta acido resistente con tappo a vite
- si aggiungevano 500 µl del terreno di coltura del campione in esame.
- 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: 50 µl di acetato di sodio 2M a ph 4,1; 650 µl di Fenolcloroformio, quindi aggiunti 500 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 visibile, formatosi sul fondo, ed il precipitato veniva lavato con 1 ml di etanolo al 100%, e lasciato asciugare.
- il precipitato veniva risospeso in 50 µl di acqua per biologia molecolare, poi utilizzato nella reazione di retrotrascrizione.

A.2.1.2.3.2. Retrotrascrizione

Per la reazione di retrotrascrizione veniva preparata una mix di reazione di volume finale di 20 µl costituita da: 4 µl di Improm-II™ 5X Reaction Buffer (Promega®); 2.4 µl MgCl₂; 1 µl di dNTP (Promega®); 5.6 ml di H₂O per biologia molecolare (SIGMA); 0.5 µl di RNAsin® Plus RNase Inhibitor (Promega®); 1 µl di Improm-IITM Reverse Transcriptase (Promega®), e 1.5 µl di primer (10 pmol/ml). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 4 µl dell’RNA risospeso. La reazione era ottenuta tramite incubazione in termociclatore per 90 minuti a 42°C e per 5 minuti a 94°C. I primer utilizzati per le RT sono riportati in tabella A.2.

Tabella A.2: Lista dei primer utilizzati per la retro trascrizione del genoma di AMPV sottotipo B.

Nome dell'amplificato	Primer
RT1	AC-Le A-Tr 15
RT2	M2 start +
RT3	L2 +
RT4	B trail less 300

A.2.1.2.3.3. PCR

Per la PCR, del volume finale di 50 µl, è stato utilizzata la seguente mix: 5 µl di 10x Pfu DNA Polymerase 10x Buffer with MgSO₄ (Promega®); 1 µl dNTP (Promega®); 36.5 µl di H₂O per biologia molecolare (SIGMA®); 1 µl (10 pmol/ml) di ciascun primer e 1 µl di Pfu DNA polymerase (Promega®). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 5 µl di prodotto della RT (cDNA).

I primer utilizzati per le PCR sono riportati in tabella A.3.

Il termociclatore era programmato come segue:

- predenaturazione a 94°C per 2 minuti
- 35 cicli di amplificazione:
 - Denaturazione a 94°C per 1 minuto
 - Appaiamento a 50°C per 30 sec
 - Estensione a 73°C per 4 minuti e 30 secondi
- Estensione finale a 72°C per 5 minuti

Tabella A.3: Lista dei primer utilizzati per l'amplificazione del genoma di AMPV sottotipo B. Sono indicate le dimensioni degli amplificati in kilobasi (kb) e i primer usati per il sequenziamento.

RT	Nome dell'amplificato	Primer forward	Primer reverse	Dimensione dell'amplificato	Primer per il sequenziamento
1	1.1	N8+	P stop-ext	2 kb	N8+, NAB1+, NAB2+
	1.2	NAB2+	B2680-	1.6 kb	PAB1+
	1.3	MAB1+	FAB4-	2.3 kb	MAB1+, MAB3+, FAB1+, FAB2+
	1.4	FAB3+	GAB3-	2 kb	FAB3+, M2AB1+, SHAB1+, GAB1+
2	2.1	GAB2+	B7840-	2 kb	GAB2+, G3-, G13+B, GAB4+
	2.2	GAB4+	LAB4-	1.8 kb	LAB1+, LAB2+
	2.3	LAB3+	LAB9-	2.3 kb	LAB3+, LAB5+, LAB6+, LAB7+
3	3	LAB8+	L44-	2.1 kb	LAB8+, LAB10+, LAB11+, LAB12+

A.2.1.2.3.4. PCR delle regioni *leader* e *trailer*

Per la PCR, del volume finale di 50 μ l, è stato utilizzata la seguente mix: 5 μ l di 10x Pfu DNA Polymerase 10x Buffer with MgSO₄ (Promega®); 1 μ l dNTP (Promega®); 36.5 μ l di H₂O per biologia molecolare (SIGMA®); 1 μ l (10 pmol/ml) di ciascun primer e 1 μ l di Pfu DNA polymerase (Promega®). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 5 μ l di prodotto della RT (cDNA).

I primer utilizzati per le PCR sono riportati in tabella A.4.

Il termociclatore era programmato come segue:

- predenaturazione a 94°C per 2 minuti
- 30 cicli di amplificazione:
 - Denaturazione a 94°C per 1 minuto
 - Appaiamento a 50°C per 30 sec
 - Estensione a 73°C per 1 minuto
- Estensione finale a 72°C per 5 minuti

Tabella A.4: primer utilizzati per l'amplificazione della regione *leader* e *trailer* del genoma di AMPV sottotipo B. Sono indicate le dimensioni degli amplificati in kilobasi (kb) e i primer usati per il sequenziamento.

RT	Nome dell'amplificato	Primer forward	Primer reverse	Dimensione dell'amplificato	Primer per il sequenziamento
1	<i>leader</i>	AC-Le A-Tr 15	B lead plus 380-	380 bp	B lead plus 380-
4	<i>trailer</i>	B trail less 300+	C trail 15	300 bp	B trail less 300+

A.2.1.2.3.5. *Nested PCR*

Per la *nested PCR*, del volume finale di 50 μ l, è stato utilizzata la seguente mix: 5 μ l di 10x Pfu DNA Polymerase 10x Buffer with MgSO₄ (Promega®); 1 μ l dNTP (Promega®); 40.5 μ l di H₂O per biologia molecolare (SIGMA®); 1 μ l (10 pmol/ml) di ciascun primer e 1 μ l di Pfu DNA polymerase (Promega®). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 1 μ l di prodotto della PCR (cDNA).

I primer utilizzati per le *nested PCR* sono riportati in tabella A.5.

Il termociclatore era programmato come segue:

- predenaturazione a 94°C per 2 minuti
- 30 cicli di amplificazione:
 - Denaturazione a 94°C per 1 minuto
 - Appaiamento a 50°C per 30 sec
 - Estensione a 73°C per 4 minuti
- Estensione finale a 72°C per 5 minuti

Tabella A.5: Lista dei primer utilizzati per le nested PCR. Sono indicati i templati di partenza, le dimensioni degli amplificati in kilobasi (kb) e i primer utilizzati per il sequenziamento.

PCR	Nome dell'amplificato	Primer forward	Primer reverse	Dimensione dell'amplificato	Primer per il sequenziamento
1.2	1.2.1	NAB2+	MAB2-	1.2 kb	PAB1+
1.3	1.3.1	MAB1+	F1-	1.3 kb	MAB1+, MAB3+
	1.3.2	FAB1+	FAB4-	1.2 kb	FAB1+, FAB2+
1.4	1.4.1	FAB3+	SH5-B	1.4 kb	FAB3+, M2:7+
	1.4.2	SHAB1+	GAB3-	1.4 kb	SHAB1+, GAB1+
2.1	2.1.1	GAB2+	G3-	0.8 kb	GAB2+, G3-
	2.1.2	G13+B	B7840-	1.3 kb	G13+B
	2.1.3	GAB4+	B7840-	1.2 kb	GAB4+
2.2	2.2.1	LAB1+	LAB4-	1.2 kb	LAB1+, LAB2+
2.3	2.3.1	LAB3+	L31-	1.4 kb	LAB3+, LAB5+
	2.3.2	LAB6+	LAB9-	1.1 kb	LAB6+, LAB7+
3	3.1	LAB8+	L47-	0.6 kb	LAB8+
	3.2	L46+	L49-	1.5 kb	L46+, LAB10+
	3.3	LAB11+	L44-	2.1 kb	LAB11+, LAB12+

A.2.1.2.4. Sequenziamento ed assemblaggio dei tratti genomici amplificati

La purificazione dei prodotti di amplificazione è avvenuta con il kit commerciale Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) attenendosi alle istruzioni riportate dal produttore. I frammenti amplificati sono stati quantificati su gel di agarosio 1% con il marker per quantificazione BenchTop pGEM DNA Ladder (Promega®) utilizzando il sistema di rilevamento GelDoc-it® imaging system (UVP®). Il sequenziamento è stato eseguito, con i primer indicati nella tabelle A.3, A.4 e A.5, mediante sequenziatore automatico ABI 3730XL 96 capillari (Applied Biosystem®). Le sequenze ottenute sono state assemblate utilizzando il software SeqMan e SeqBuilder del pacchetto DNASTAR® (Lasergene®).

A.2.1.2.5. Analisi dei genomi

Le sequenze complete dei ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04 ottenute sono state confrontate con quelle del ceppo vaccinale utilizzato nell'allevamento dove i virus sono stati isolati (Vaccino B) e due altri ceppi italiani AMPV/B: un ceppo isolato nell'87 (IT/Ty/Vr240/87) ed uno nel 2004 (IT/Ty/205-16/04) (Catelli *et al.*, 2010). Il ceppo pre 1994 è stato considerato in quanto contemporaneo del ceppo progenitore del vaccino in esame, che è stato isolato in Francia nel 1986 (Eterdossi *et al.*, 1995). Le sequenze sono state allineate per il confronto utilizzando i programmi Bioedit Sequence alignment software e MegAlign (Lasergene®) mediante il metodo Clustal W (Larkin *et al.* 2007).

A.2.1.3. Valutazione della Virulenza del ceppo IT/Ty/129-08/04 di origine vaccinale

Allo scopo di determinare la patogenicità del ceppo IT/Ty/129-08/04 è stata eseguita infezione sperimentale che prevedeva l'inoculo di tacchini di un giorno di vita. La patogenicità del virus è stata valutata mediante osservazione della sintomatologia clinica a confronto con un gruppo di controllo negativo.

A.2.1.3.1. Virus

Il ceppo AMPV IT/Ty/129-08/04 (II passaggio su TOC) è stato somministrato per via oculo nasale quale surnatante colturale alla dose $10^{3.3}$ CD₅₀ per soggetto. Il titolo è stato calcolato mediante metodo di Reed e Muench (1938).

A.2.1.3.2. Titolazione del Virus IT/Ty/129-08/04

il virus è stato diluito in terreno MEM SF 10X fino alla diluizione -6. Per ogni diluizione sono state inoculate 5 TOC secondo la procedura descritta al paragrafo A.2.3.4.2. A 10 giorni post inoculazione è stata eseguita la lettura delle TOC per valutare la ciliostasi. Il titolo è stato calcolato mediante metodo di Reed e Muench (1938) ed espresso come dosi ciliostatiche medie (CD_{50}) per unità di volume.

A.2.1.3.3. Tacchini da carne

Sono stati utilizzati tacchini commerciali di 1 giorno di vita, non vaccinati nei confronti delle infezioni da AMPV. Gli animali provenivano da un incubatoio che applicava elevati standard di biosicurezza.

A.2.1.3.4. Piano sperimentale

L'infezione sperimentale è stata eseguita in isolatori per pollame ed ha avuto durata di 14 giorni. Sono stati utilizzati 28 tacchini suddivisi in 2 gruppi da 14 soggetti ciascuno. Al primo giorno di vita gli animali sono stati inoculati con come di seguito riportato: gruppo 1 con il virus IT/Ty/129-08/04; gruppo 2 (controllo negativo) inoculato con acqua sterile. Gli animali erano indentificati con anelli numerati alle zampe. Giornalmente, a partire dal primo giorno post inoculazione e sino al termine della prova, gli animali erano osservati individualmente per valutare la sintomatologia clinica. A fine prova tutti i soggetti dei gruppi sono stati soppressi mediante dislocazione delle vertebre cervicali e smaltiti mediante incenerimento secondo normativa vigente.

A.2.1.3.5. Controllo della sintomatologia clinica

Alla sintomatologia clinica è stato attribuito un punteggio secondo lo schema riportato in tabella A.5 (Naylor e Jones, 1994).

Tabella A.6: Score utilizzato per la valutazione della sintomatologia clinica.

Sintomi	Punteggio
Assenza di sintomi	0
Scolo nasale limpido	1
Scolo nasale torbido	2
Essudato schiumoso oculare e/o rigonfiamento seni infraorbitali	3

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

La normalità della distribuzione campionaria 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' stata 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.

A.3. RISULTATI

A.3.1. Analisi filogenetica

Gli alberi filogenetici costruiti sulle sequenze nucleotidiche ed aminoacidiche dei geni G ed F mostrano la stessa topologia. Sia l'albero costruito sul gene F (Figura A.2a) che quello costruito sul gene G (Figura A.2b) mostrano i ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04 che si raggruppano con il Vaccino B.

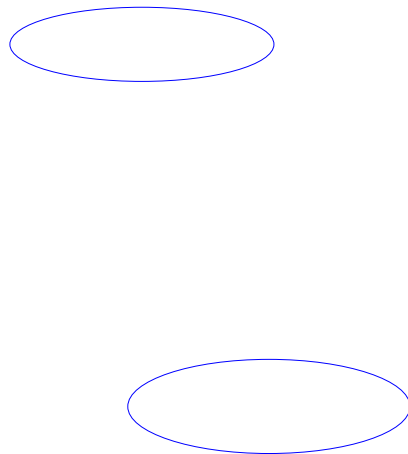


Figura A.2: Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche dei geni F (a) e G (b) di AMPV sottotipo B. Sono evidenziati i ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04. La barra rappresenta il numero di sostituzioni nucleotidiche per sito.

A.3.2. Analisi di sequenza del genoma

A.3.2.1. Amplificazione del genoma

La metodica messa a punto ha permesso di sequenziare l'intero genoma di entrambe i ceppi isolati. Sono stati ottenuti tutti gli ampliconi indicati nel protocollo. Questi erano delle dimensioni attese ma in qualche caso è stato necessario provvedere ad amplificazione mediante *nested* PCR a causa di bande aspecifiche o di bassa concentrazione dei prodotti.

A.3.2.2. Analisi di sequenza del genoma

I genomi del vaccino B, IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04 hanno la stessa lunghezza, 13508 basi. La sequenza, la posizione e la dimensione dei promotori dei geni, degli ORF e delle regioni intergeniche non presentano alcuna differenza ad eccezione delle mutazioni nucleotidiche riportate in tabella A.6. Il confronto tra i genomi di IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04 mette in evidenza una sola mutazione nucleotidica in posizione genomica 12847. Il confronto con i ceppi italiani di riferimento mette in evidenza differenze nella lunghezza del genoma, maggiore nei ceppi di riferimento italiani (13510 basi per IT/Ty/240VR/87 e 13513 per IT/Ty/205-16/04). Nella tabella A.7 sono riportate le percentuali di identità e divergenza tra le sequenze.

Tabella A.7: Mutazioni nucleotidiche osservate nel confronto tra la sequenza completa del vaccino B e gli isolati IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04.

POSIZIONE*	Vaccino B	IT/Ty/129-08/04	IT/Ty/132-08/04
1461	A	G	G
3508	G	A	A
3566	C	T	T
4348	A	G	G
5614	A	T	T
6487	T	G	G
12277	G	A	A
12847	T	T	C
*posizione genomica			

Tabella A.8: Grado di identità e divergenza fra i genomi dei ceppi esaminati. Nella parte superiore della tabella è riportato il grado d'identità nucleotidica. Ciò indica la percentuale dei residui identici sulla lunghezza totale. Nella parte inferiore è riportata il grado di divergenza nucleotidica, che indica la percentuale dei residui differenti sulla lunghezza totale.

		IDENTITÀ				
		Vaccino B	IT/Ty/129-08/04	IT/Ty/132-08/04	IT/Ty/240VR/87	IT/Ty/205-16/04
DIVERGENZA	Vaccino B		99,9	99,9	99,6	98,3
	IT/Ty/129-08/04	0,1		100	99,5	98,3
	IT/Ty/132-08/04	0,1	0		99,5	98,3
	IT/Ty/240VR/87	0,4	0,5	0,6		98,4
	IT/Ty/205-16/04	1,7	1,7	1,7	1,5	

A.3.3. Valutazione della Virulenza del ceppo IT/Ty/129-08/04 di origine vaccinale

Nel gruppo inoculato con il ceppo IT/Ty/129-08/04 la sintomatologia, inizialmente lieve, è comparsa a partire dal 2° giorno post infezione in un soggetto per poi diffondersi a tutti gli altri animali. Il massimo punteggio medio (>2) si è registrato il 7° giorno p.i. 2 soggetti hanno mostrato per periodi di 2 o 3 giorni rigonfiamento dei seni infraorbitali ed essudato schiumoso a livello oculare. Nel gruppo di controllo negativo la sintomatologia non ha mai superato lo score medio giornaliero di 0,36. Il punteggio medio cumulativo della sintomatologia clinica durante l'osservazione è stato: 11,5 nel gruppo inoculato con il ceppo IT/Ty/129-08/04 e 0,64 per il controllo negativo.

Tabella A.8: Gruppo 1 - inoculato con IT/Ty/129-08/04. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

SOGGETTI	GIORNI POST INFEZIONE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1	0	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	0
2	0	0	1	1	2	2	3	3	1	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	2	2	3	3	3	0	0	0	0
4	0	0	0	0	1	2	1	1	2	1	1	1	0	0
5	0	0	0	0	1	1	2	1	0	1	0	0	1	0
6	0	0	0	1	2	2	3	2	1	1	0	0	0	0
7	0	0	0	1	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0
8	0	0	0	1	2	3	2	2	1	1	1	1	0	0
9	0	0	0	0	2	3	3	1	1	0	0	0	0	0
10	0	0	1	1	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0
11	0	0	0	1	2	1	2	2	1	0	0	0	0	0
12	0	0	0	1	2	2	3	2	1	1	1	1	0	0
13	0	0	1	1	2	1	2	1	1	1	0	0	1	0
14	0	0	0	0	1	2	2	2	0	0	0	0	0	0
MEDIA	0	0,07	0,21	0,64	1,64	1,93	2,29	1,71	1,14	0,93	0,36	0,36	0,21	0

Tabella A.9: Gruppo 2 – Controllo negativo. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

SOGGETTI	GIORNI POST INFEZIONE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDIA	0	0,14	0	0	0,07	0	0	0,36	0,07	0	0	0	0	0

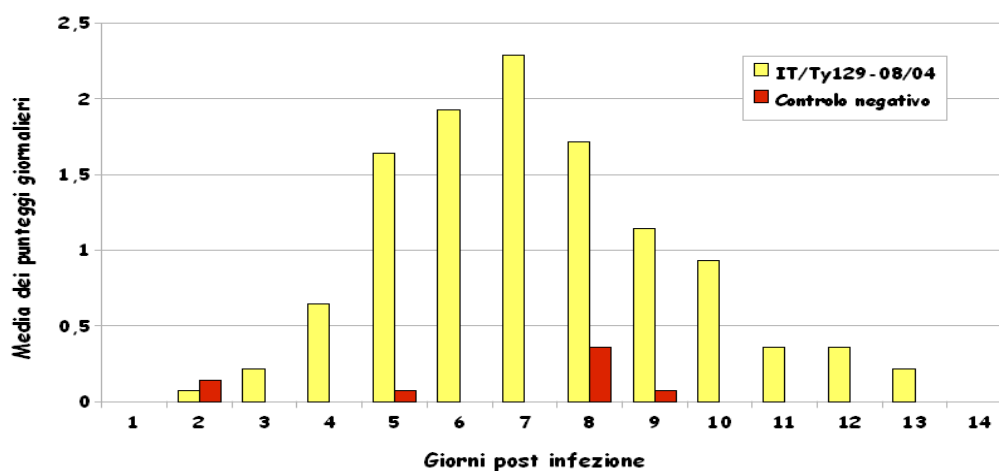


Figura A.3: Media delle osservazioni cliniche giornaliere dei gruppi IT/Ty/129-08/04 e di controllo negativo

Il confronto tra il valore del punteggio nel gruppo infettato con il ceppo IT/Ty/129-08/04 e il gruppo di controllo ha messo in evidenza una differenza statisticamente significativa (con il gruppo di controllo U di Mann Whitney=9597 e $p < 0,0001$) (tabella A.10).

Tabella A.10: Confronto tra il gruppo infettato con IT/Ty/129-08/04 e il gruppo di controllo.

GRUPPO	Numerosità	Minimo	Massimo	Media punteggi	Deviazione standard
IT/Ty/129-08/04	196	0	1	0,82	0,91
C.Negativo	196	0	3	0,05	0,21
U di Mann- Whitney = 9597; $p < 0,0001$					

A.4. DISCUSSIONE

I dati riportati in questo capitolo dimostrano l'origine vaccinale di ceppi AMPV sottotipo B, isolati in corso di focolai precoci di TRT in tacchini vaccinati con sottotipo omologo. Tali risultati approfondiscono quanto precedentemente osservato da Catelli *et al.* (2010) nel cui lavoro veniva riportato l'isolamento dei virus sottotipo B IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04, a 4 settimane dopo la vaccinazione in incubato con vaccino vivo spray dell'omologo sottotipo. In questo lavoro gli autori ipotizzavano che i ceppi fossero di origine vaccinale, sulla sola base dell'analisi di sequenza dei geni G ed F. Nel lavoro riportato in questo capitolo la suddetta ipotesi viene dimostrata mediante sequenziamento completo degli isolati, paragone con l'intera sequenza del vaccino, e valutazione della patogenicità in condizioni sperimentali. Viene quindi dimostrato per un vaccino AMPV sottotipo B quanto già dimostrato per un vaccino sottotipo A da Catelli *et al.* (2006).

In condizioni sperimentali i vaccini vivi attenuati per AMPV offrono buona protezione e non mostrano sintomatologia post-vaccinale. Vengono somministrati ad un ristretto numero di animali, per via oculare: un metodo sicuramente preciso ed efficiente. Nell'allevamento intensivo generalmente è applicato il metodo spray che permette una veloce vaccinazione di massa. In queste condizioni è però più alta l'evenienza che alcuni animali possano rimanere scoperti ed infettarsi con il virus vaccinale eliminato dai soggetti vaccinati. Uno studio condotto, in condizioni sperimentali, su un vaccino sottotipo A ha dimostrato il recupero della virulenza dopo 4-10 retropassaggi (Naylor e Jones, 1994). Partendo da questa osservazione si può ipotizzare che in condizioni di campo il virus vaccinale, sia eliminato per 3-4 giorni dalla somministrazione e, in situazioni in cui rimanga un numero sufficiente di soggetti scoperti, possa andare incontro a riacquisizione della virulenza e provocare sintomatologia approssimativamente tra 2 e 5 settimane a partire dalla vaccinazione stessa. I ceppi oggetto di questo studio sono stati isolati 4 settimane dopo la vaccinazione.

Il confronto delle sequenze complete mette in evidenza l'alto grado di identità tra i ceppi IT/Ty/129-08/04, IT/Ty/132-08/04 e il vaccino B. Essi hanno stessa lunghezza del genoma e presentano solo 8 mutazioni rispetto al virus vaccinale, risultando identici tra loro fatta eccezione per la mutazione silente in posizione 12847 di IT/Ty/132-08/04. Questo indicherebbe che il processo di reversione a virulenza interessa gli stessi punti del genoma producendo mutazioni specifiche e costanti. Sarebbe oltremodo interessante indagare quale di queste sia responsabile della riacquisizione della virulenza. Mediante un sistema di *reverse genetics*, come quello messo a punto da Naylor *et al.* (2004) per il sottotipo A, è possibile introdurre le mutazioni osservate nei ceppi ritornati a virulenza, nel genoma del vaccino e verificare quale di queste sia in grado di causare la patogenicità del virus per le specie sensibili. L'area geografica dove erano collocati i due allevamenti oggetto degli studi presenta un'elevatissima concentrazione di allevamenti avicoli, gestiti in gran parte da un'unica azienda integrata, che applica stringenti misure di biosicurezza. Non vi è in genere introduzione di animali da aree esterne. I due allevamenti distano tra loro circa 100 km di distanza, e al momento del campionamento erano gestiti da personale tecnico e veterinario dedicato. Gli animali dei due allevamenti campionati provenivano da due schiuse diverse, ed erano stati accasati a distanza di una settimana. Queste condizioni permettono di escludere cross contaminazione fra i ceppi esaminati: in allevamento i campionamenti sono stati eseguiti in tempi e da personale diversi; in laboratorio i campioni non sono stati trattati contemporaneamente.

L'analisi filogenetica basata sui geni G ed F ha dimostrato che i ceppi IT/Ty/129-08/04 e IT/Ty/132-08/04 sono filogeneticamente correlati al vaccino B utilizzato in incubatoio e distanti dai ceppi di campo circolanti nell'area al momento dell'isolamento. La clusterizzazione su base temporale, evidente nell'analisi del gene G, mostra come i ceppi di origine vaccinale risultino filogeneticamente più vicini a quelli circolanti in Europa in un periodo (prima del 1994) ed in un'area geografica sovrapponibili a quelli del virus progenitore del vaccino, isoalti oltre venti anni fa e non recentemente.

Infine l'infezione sperimentale ha permesso di testare la virulenza del ceppo IT/Ty/129-08/04,

confermando l'avvenuta riacquisizione in campo della capacità del virus di causare la malattia. Sulla base delle differenze genetiche, limitate ad una singola mutazione conservativa, si può ipotizzare che anche il ceppo IT/Ty/132-08/04 condivida stessa virulenza, del quale è comunque richiesta una conferma sperimentale.

Gli studi riportati dimostrano come un vaccino vivo attenuato per AMPV sottotipo B può andare incontro, in condizioni di campo, a riacquisizione della virulenza ed essere causa dei focolai precoci di infezione. Non per la prima volta si osserva in campo la riacquisizione della virulenza da parte di un vaccino per AMPV e le osservazioni qui riportate confermano quanto precedentemente riportato riguardo il sottotipo A (Catelli et al, 2006). Tale evenienza può essere prevenuta da una corretta vaccinazione che impedisca che alcuni soggetti nel gruppo rimangano non vaccinati e fungano da substrato per i retropassaggi e dalla messa a punto di vaccini più stabili. Oggi la vaccinazione è ancora l'unico metodo di controllo per le infezioni da AMPV ma è auspicabile la messa a punto di nuovi e più stabili vaccini preparati con tecniche biomolecolari (Kapczynski e Sellers, 2003; Naylor *et al.*, 2004a; Naylor *et al.*, 2004b) che possano limitare questa indesiderabile evenienza e garantire maggiore efficacia alla vaccinazione.

B. CIRCOLAZIONE DI CAMPO DI UN CEPPLO PATOGENO DI METAPNEUMOVIRUS AVIARE ORIGINATO DA VIRUS VACCINALE

B.1. INTRODUZIONE

Studi epidemiologici sulle infezioni da AMPV in Italia, a partire dal 1987, hanno mostrato una chiara prevalenza del sottotipo B (Catelli *et al.*, 2004) e in generale, per il controllo della malattia, è largamente diffuso l'uso di vaccino vivo attenuato sottotipo B. In misura molto più limitata anche i vaccini vivi attenuati sottotipo A vengono utilizzati sebbene sino al 2003 non fossero mai stati identificati virus di campo appartenenti a questo sottotipo. Catelli *et al.* (2006) hanno dimostrato la reversione a virulenza di un vaccino vivo attenuato sottotipo A che era stato somministrato a tacchini di un giorno di vita, via spray, in incubatoio. Dopo 3 settimane erano comparsi segni clinici riferibili a TRT e un AMPV sottotipo A era stato isolato e caratterizzato mediante sequenziamento dell'intero genoma. Il confronto delle sequenze complete dei genomi del vaccino A e del suo progenitore ha portato all'identificazione di 9 marker vaccinali. Queste specifiche mutazioni, sono i nucleotidi che cambiano durante il processo di attenuazione e risultano essere costanti per posizione nel genoma e per tipo di nucleotide coinvolto. Catelli *et al.* (2006) hanno descritto i marker vaccinali per un vaccino sottotipo A e li hanno utilizzati per caratterizzare un ceppo sottotipo A isolato e dimostrare che fosse inequivocabilmente di origine vaccinale. Alcuni anni prima Cecchinato *et al.* (2003) hanno riportato l'isolamento di AMPV sottotipo A (ceppo 259-01/03) da tacchini durante un focolaio di TRT. Gli animali erano stati vaccinati a 7 giorni di vita con un vaccino vivo attenuato sottotipo B, in forma spray, e avevano mostrato sintomi della malattia 6 settimane dopo vaccinazione. Allo scopo di valutare la sua possibile origine vaccinale, questo isolato sottotipo A è stato caratterizzato mediante analisi di sequenza e valutazione di patogenicità.

B.2. MATERIALI E METODI

B.2.1. Identificazione dei marker vaccinali

Per identificare la presenza dei marker vaccinali il genoma del ceppo 259-01/03, a partire dal secondo passaggio su TOC, è stato completamente sequenziato e confrontato con le sequenze complete del genoma del vaccino sottotipo A e del suo progenitore (ceppo #8544), riportate da Catelli et al. (2006).

B.2.1.1. Estrazione dell'RNA ed RT PCR

L'estrazione è stata eseguita secondo il metodo descritto nel paragrafo A.2.3.2.1. L'intero genoma è stato amplificato seguendo la metodica descritta da Naylor *et al.* (2004)(figura B.1).

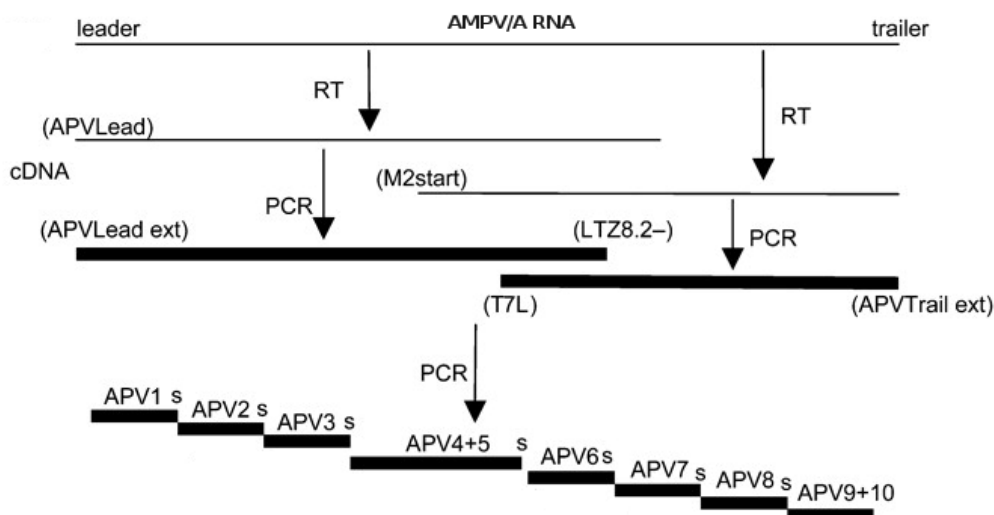


Figura B.1: Schema utilizzato per ottenere l'amplificazione dell'intero genoma di AMPV sottotipo A. Dall'RNA estratto, mediante due retro-trascrizioni, sono state ottenute copie in DNA overlapping. Da queste sono stati ottenuti due amplificati, utilizzati successivamente come template per 8 ulteriori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

B.2.1.2. Sequenziamento ed assemblaggio dei tratti genomici amplificati

La purificazione dei prodotti di amplificazione è avvenuta con il kit commerciale Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) attenendosi alle istruzioni riportate dal produttore. I frammenti amplificati sono stati quantificati su gel di agarosio 1% con il *marker* per quantificazione BenchTop pGEM DNA Ladder (Promega®) utilizzando il sistema di rilevamento GelDoc-it® imaging system (UVP®). Il sequenziamento è stato eseguito, con i primer indicati nella tabelle A.3, A.4 e A.5, mediante sequenziatore automatico ABI 3730XL 96 capillari (Applied Biosystem®). Le sequenze ottenute sono state assemblate utilizzando il software SeqMan e SeqBuilder del pacchetto DNASTAR® (Lasergene®).

B.2.1.3. Analisi della sequenza per la ricerca di *marker* vaccinali

Le sequenze nucleotidiche del genoma ottenute sono state allineate con le analoghe sequenze del progenitore e del vaccino. Per il confronto sono stati utilizzati i programmi Bioedit Sequence alignment software e MegAlign (Lasergene®) mediante il metodo Clustal W (Larkin et al. 2007).

B.2.2. Valutazione della virulenza del ceppo 259-01/03

Al fine di determinare la patogenicità dell'isolato 259-01/03 è stata eseguita un' infezione sperimentale in ambiente controllato di tacchini sensibili, per valutare la sintomatologia clinica da esso determinata, a confronto con un gruppo di controllo inoculato con una overdose di vaccino, dal quale il ceppo è derivato, ed un gruppo di controllo negativo.

B.2.1.1. Virus e ceppo vaccinale

Il ceppo AMPV 259-01/03 era stato isolato su organo colture di anelli tracheali di pollo (TOC) e caratterizzato come sottotipo A da Cecchinato *et al.* (2003). Per l'inoculazione il virus è stato utilizzato al II passaggio su TOC.

B.2.1.2. Titolazione del ceppo 259-01/03

Il virus è stato diluito in terreno MEM SF 10X fino alla diluizione 10^{-6} . Per ogni diluizione sono state inoculate 5 TOC. A 10 giorni post inoculazione è stata eseguita la lettura delle TOC per valutare la ciliostasi. Il titolo è stato calcolato mediante metodo di Reed e Muench (1938) ed espresso come dosi ciliostatiche medie (CD_{50}) per unità di volume.

B.2.1.3. Piano sperimentale

L'infezione sperimentale è stata eseguita in ambiente biologicamente confinato ed ha avuto durata di 14 giorni. Sono stati utilizzati 33 tacchini suddivisi in 3 gruppi da 11 soggetti ciascuno. Gli animali erano indentificati con anelli numerati posti sulle zampe. Al primo giorno di vita gli animali sono stati inoculati per via oculonasale, secondo lo schema di seguito riportato: gruppo 1 con il virus 259-01/03; gruppo 2 con 10 volte la dose di vaccino commerciale raccomandata dal produttore; gruppo 3 di controllo negativo inoculato con acqua sterile. Il virus in esme ed il vaccino sono stati inoculati quali surnatanti colturali alla dose rispettivamente di $10^{3.5} CD_{50}$ e $10^{4.5} CD_{50}$ per soggetto. Quest'ultima corrispondente a 10 volte la dose consigliata per la vaccinazione. Giornalmente, a partire dal primo giorno post inoculazione e sino al termine della prova, gli animali sono stati osservati individualmente per la valutazione della sintomatologia clinica. A fine prova tutti i soggetti sono stati soppressi mediante dislocazione delle vertebre cervicali e smaltiti mediante incenerimento secondo normativa vigente.

B.2.1.4. Misurazione della sintomatologia clinica

È stato eseguita secondo quanto riportato nel paragrafo A.2.1.3.5.

B.3. RISULTATI

B.3.1. Identificazione dei *marker* vaccinali

Il sequenziamento dell'intero genoma, nel confronto con il genoma del vaccino e del suo progenitore (riportati da Catelli *et al.* 2006) ha permesso di identificare la presenza di 8 su 9 *marker* vaccinali. In posizione nucleotidica 3553 il ceppo risulta diverso dal vaccino ed identico al progenitore. Inoltre il confronto delle sequenze complete dei genomi ha permesso di individuare altre mutazioni esclusive del ceppo 259-01/03 riportate in tabella B.2.

Tabella B.1: *Marker* vaccinali: nucleotidi e posizione genomica.

Posizione genomica	Progenitore§	Vaccino A§	259-01/03
2941	G	A	A
3553	T	C	T
3825	G	A	A
5055	A	G	G
5140	T	C	C
5929	A	G	G
6358	T	C	C
10022	T	G	G
11624	T	C	C

§ da Catelli *et al.* 2006

Tabella B.2: Mutazioni nucleotidiche osservate nel confronto tra la sequenza completa del ceppo 259-01/03 e il vaccino A e il suo progenitore. Essendo mutazioni in regioni codificanti sono riportati gli aminoacidi espressi.

Posizione genomica	Progenitore§		Vaccino A§		259-01/03	
	Nucleotide	Aminoacido	Nucleotide	Aminoacido	Nucleotide	Aminoacido
1932	C	A	C	A	A	E
2197	C	S	C	S	A	Y
7069	T	Y	T	Y	C	Y
8766	C	L	C	L	T	L

§ da Catelli *et al.* 2006

B.3.2. Valutazione della virulenza del ceppo 259-01/03

Nel gruppo inoculato con il ceppo 259-01/03 la sintomatologia, inizialmente lieve, è comparsa a partire dal 2° giorno post infezione in due soggetti per poi presentarsi in tutti gli altri soggetti. Il massimo punteggio medio (>2) si è registrato il 7° giorno p.i.. 2 soggetti hanno mostrato per periodi di 2 o 3 giorni rigonfiamento dei seni infraorbitali ed essudato schiumoso a livello oculare. Sia nel gruppo di controllo negativo che nel gruppo inoculato con overdose di vaccino la sintomatologia non ha mai superato lo score medio giornaliero di 0,36. Il punteggio medio cumulativo della sintomatologia clinica durante l'osservazione è stato: 15,4 nel gruppo inoculato con il ceppo 259-01/03, 0,64 per il controllo negativo e 1,54 per il gruppo inoculato con l'overdose di vaccino.

Tabella B.3: Gruppo 1 - inoculato con 259-01/03. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

SOGGETTI	GIORNI POST INFEZIONE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	1	2	2	2	3	2	1	2	1	1	0	0
2	0	0	0	2	2	2	2	3	1	1	1	0	0	0
3	0	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0
4	0	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0
5	0	1	1	2	2	2	3	2	2	1	0	0	0	0
6	0	0	1	2	2	2	2	1	2	1	0	0	0	0
7	0	0	1	1	2	2	3	2	1	1	0	0	0	0
8	0	0	1	2	2	2	2	2	1	1	0	1	1	0
9	0	0	1	2	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0
10	0	0	1	2	1	1	2	2	1	2	0	1	0	0
11	0	0	1	1	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0
MEDIA	0	0,18	0,91	1,82	2	2	2,36	2,18	1,55	1,27	0,55	0,55	0,09	0

Tabella B.4: Gruppo 2 – inoculato con overdose di vaccino. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

SOGGETTI	GIORNI POST INFEZIONE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
11	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
MEDIA	0	0	0,09	0,18	0,27	0,18	0,09	0	0	0,18	0,09	0,18	0,27	0

Tabella B.5: Gruppo 3 – Controllo negativo. Punteggi delle osservazioni cliniche giornaliere dei singoli soggetti e media giornaliera.

SOGGETTI	GIORNI POST INFEZIONE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MEDIA	0	0,18	0	0,09	0	0	0	0,36	0,09	0	0	0	0	0

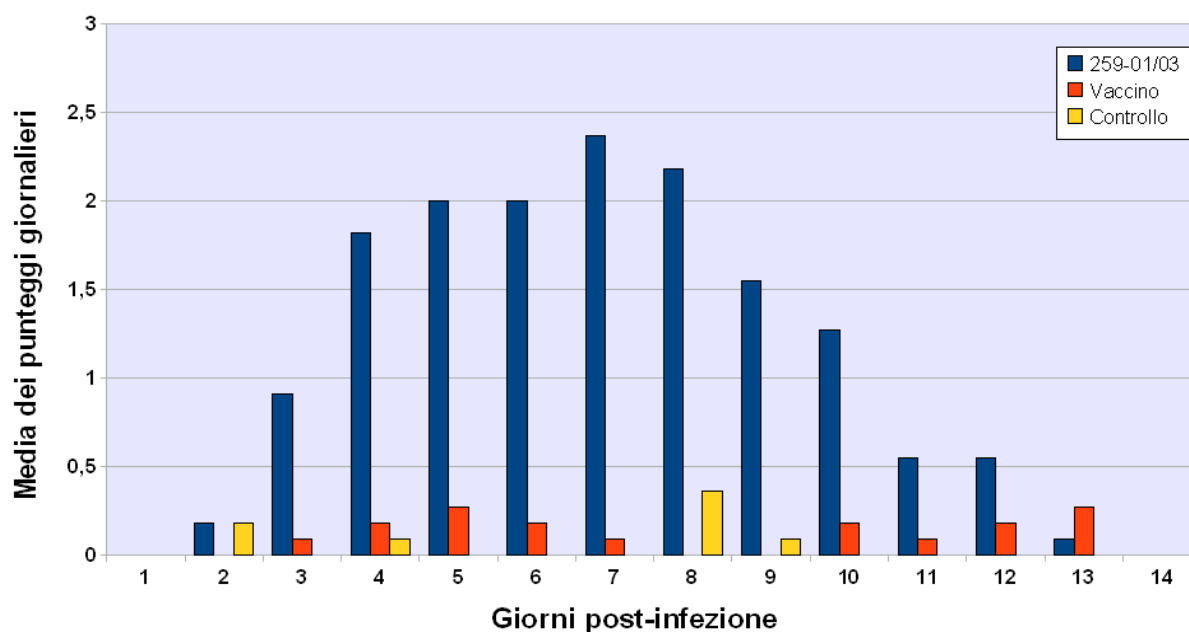


Figura B.2: Media delle osservazioni cliniche giornaliere dei gruppi 259-01/03, Vaccino e di Controllo Negativo

Il confronto tra il valore del punteggio nel gruppo infettato con il ceppo 259-01/03 e gli altri due gruppi ha messo in evidenza una differenza statisticamente significativa (con il gruppo di controllo U di Mann Whitney = 18947 e $p < 0,0001$; con il gruppo inoculato con overdose di vaccino U di Mann Whitney = 18531 e $p < 0,0001$) (tabella B.6 e B.7). In particolare il gruppo inoculato con 259-01/03 presentava punteggi più elevati. Non sono invece state riscontrate differenze statisticamente significative ($p = 0,125$) tra il gruppo di controllo e il gruppo che ha ricevuto overdose di vaccino (tabella B.8).

Tabella B.6: Confronto tra il gruppo inoculato con 259-01/03 ed il vaccino.

GRUPPO	Numerosità	Minimo	Massimo	Media punteggi	Deviazione standard
259-01/03	154	0,000	3,000	1,104	1,011
Vaccino	154	0,000	2,000	0,110	0,354
U di Mann- Whitney = 18531; $p < 0,0001$					

Tabella B.7: Confronto tra il gruppo inoculato con 259-01/03 ed il gruppo di controllo negativo.

GRUPPO	Numerosità	Minimo	Massimo	Media punteggi	Deviazione standard
259-01/03	154	0	3	1,1	1,01
C.Negativo	154	0	1	0,05	0,22
U di Mann- Whitney = 18947; $p < 0,0001$					

Tabella B.8: Confronto tra il gruppo inoculato con overdose di vaccino ed il controllo negativo.

GRUPPO	Numerosità	Minimo	Massimo	Media punteggi	Deviazione standard
Vaccino	154	0	2	0,11	0,35
C.Negativo	154	0	1	0,05	0,22
U di Mann- Whitney = 12405; $p = 0,125$					

B.4. DISCUSSIONE

I risultati di questo studio riportano l'isolamento, da un focolaio di campo di TRT, di un vaccino sottotipo A che ha riacquisito la virulenza. La presenza nell'isolato di otto *marker* vaccinali su nove dimostra incontrovertibilmente che il ceppo è di origine vaccinale, e l'infezione sperimentale ne conferma la patogenicità. Viene quindi confermato quanto riportato in un precedente lavoro (Catelli *et al.*, 2006) nel quale è stato isolato un AMPV sottotipo A di origine vaccinale in grado di causare in campo sintomatologia respiratoria caratteristica della TRT e patogeno all'infezione sperimentale.

Il paragone delle sequenze nucleotidiche complete dell'isolato 259-01/03, con il vaccino ed il progenitore della stesso, ha permesso anche di evidenziare che nella posizione del *marker* vaccinale mancante (3553) il virus è uguale al progenitore. Questa mutazione, che necessita ulteriori approfondimenti, potrebbe essere significativa nel processo di rivirulentazione.

Delle 4 mutazioni esclusive del ceppo 259-01/03, quella in posizione 1932 è la più interessante. È una mutazione non sinonima nella sequenza nucleotidica del gene che codifica per la proteina P, che causa la codificazione di un acido glutammico, amminoacido polare idrofilico, al posto di una alanina, amminoacido neutro non polare, che è invece presente nel vaccino e nel progenitore. Questa sostituzione potrebbe avere effetti sulla proteina finale e, dato che la proteina P fa parte del complesso della polimerasi virale, coinvolgere l'intero complesso. Gli effetti sulla patogenicità virale delle 4 singole mutazioni osservate, potranno essere studiate mediante reverse genetics (Naylor *et al.*, 2004). Tale sistema permette, come già accennato precedentemente, di introdurre mutazioni specifiche nel genoma di AMPV e di valutare l'influenza sul fenotipo virale.

Contrariamente a quanto riportato da Catelli *et al.* (2006), nel presente studio il virus è stato isolato in un allevamento nel quale non era stata effettuata vaccinazione con AMPV del sottotipo omologo. Esso quindi, verosimilmente, è stato introdotto dall'ambiente esterno o, ipotesi meno probabile, ha persistito nell'allevamento da una precedente vaccinazione con sottotipo A. Non essendo disponibili informazioni sui piani vaccinali eseguiti precedentemente nell'allevamento, non si può escludere che il virus vaccinale sia sopravvissuto nell'ambiente a seguito di un utilizzo precedente. Studi sulla resistenza di AMPV nell'ambiente (Velayudhan *et al.* 2003) hanno riportato come sia possibile isolare il virus dalla lettiera dopo stoccaggio della stessa a 8°C per 30 giorni. Quando lo stoccaggio della lettiera avviene a temperatura ambiente il virus può essere isolato al massimo per 3 giorni. Considerati questi dati si può ipotizzare una persistenza del virus nell'ambiente in situazioni in cui non fosse applicata una corretta pulizia e disinfezione del capannone. Non è comunque da escludere l'altra ipotesi che il virus sia stato introdotto nell'ambiente di allevamento da personale proveniente da altri allevamenti nei quali era stata effettuata la vaccinazione con il vaccino sottotipo A. Limiti nell'applicazione delle misure di biosicurezza potrebbero aver favorito la circolazione di un ceppo di origine vaccinale tra un allevamento e l'altro attraverso personale tecnico veterinario o mezzi di trasporto. A supporto di ciò, Tiwari *et al.* (2006a) in uno studio sulla resistenza virale su differenti superfici, dimostrano una maggior resistenza su 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 e fino a 72h su acciaio, lattice, piastrelle, stivali di gomma, gomma da pneumatici e guscio d'uovo. Su piumino e cartoni portauova il virus è stato evidenziato sino a 6 giorni.

Un ulteriore dato che emerge dallo studio è relativo al fatto che gli animali, che erano stati vaccinati con un vaccino sottotipo B, hanno manifestato sintomi di TRT dovuti ad AMPV sottotipo A, 6 settimane dopo la vaccinazione. Questo dato conferma quanto già precedentemente riportato da Van de Zande *et al.* (2000), riguardo alla cross-protezione fra sottotipi che risulta limitata nel tempo rispetto alla protezione che si ottiene fra sottotipi omologhi.

C. INFEZIONE DA METAPNEUMOVIRUS AVIARE NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO DELLA GALLINA OVAIOLA: INDAGINI DI CAMPO

C.1. INTRODUZIONE

Alla fine degli anni '80 la TRT compare in Italia nell'allevamento del tacchino e l'infezione si diffonde nel tempo a tutte le specie sensibili. Negli anni l'infezione si è diffusa parallelamente anche nel pollo causando danni legati principalmente alle infezioni secondarie, al ridotto accrescimento degli animali e, negli animali in deposizione, alla riduzione della produzione e qualità delle uova.

Se il quadro epidemiologico della diffusione di AMPV nell'allevamento del tacchino e del pollo da carne è piuttosto chiaro, e ben conosciute sono le problematiche sanitarie correlate ad esso, scarse e frammentarie risultano le informazioni relative all'impatto che tale infezione ha sul settore produzione di uova da consumo. In campo, in questo settore, si riportano frequenti cali produttivi, non riferibili ad agenti eziologici responsabili comunemente di tali manifestazioni, che a posteriori vengono correlati ad AMPV per sole evidenze sierologiche, e sulla base delle quali spesso vengono poi applicati programmi vaccinali di non comprovata efficacia. D'altro canto anche i lavori scientifici disponibili sull'argomento non spiegano adeguatamente le osservazioni cliniche, poiché in condizioni sperimentali l'infezione per vie naturali non è in grado di determinare calo dell'ovodeposizione che invece si manifesta a seguito di inoculazione del virus per via endovenosa.

Allo scopo di delineare un quadro della situazione di campo il più possibile aderente alla realtà e sulla base di questo sviluppare adeguati piani profilattici è stata iniziata sul territorio nazionale, in particolare nelle aree a rischio d'infezione, un'indagine sulla diffusione di AMPV nell'allevamento della gallina ovaiole, oggetto della presente tesi. La ricerca è stata finanziata dalla Intervet Italia che ha anche collaborato alla pianificazione ed esecuzione del campionamento.

Il progetto prevedeva in particolare studi longitudinali e campionamenti singoli in allevamenti per la produzione di uova da consumo sia in fase pollastra che ovaiole, per la ricerca di AMPV abbinando tecniche diagnostiche sierologiche e di biologia molecolare. Dove possibile i risultati erano integrati con i dati produttivi dell'allevamento e gli eventuali piani vaccinali applicati.

C.2. MATERIALI E METODI

C.2.1. PIANO SPERIMENTALE

Nel periodo compreso tra ottobre 2006 e dicembre 2007 sono stati oggetto di studio 19 allevamenti per la produzione di uova da consumo, alcuni in fase pollastra altri in fase ovaiole, localizzati in zone ad elevata densità avicola del Nord Italia e quindi ad alto rischio di infezione da AMPV. Molti di questi allevamenti presentavano pregressi problemi legati a sintomi respiratori, con calo di ovodeposizione nelle ovaiole, soprattutto nel periodo susseguente l'accasamento, e sono stati scelti in accordo con i veterinari d'azienda. All'interno di ogni allevamento sono stati oggetto d'indagine 1 o più gruppi di animali. Per ogni gruppo veniva compilata una "scheda di allevamento/gruppo", appositamente allestita nell'ambito della ricerca per la raccolta dei dati. In essa venivano riportati l'ubicazione della struttura, il numero di soggetti, l'età, le vaccinazioni per AMPV eseguite, eventuale sintomatologia clinica pregressa o in atto (forme respiratorie e/o calo dell'ovodeposizione), campioni prelevati, etc.

Nella tabella B.1 sono riportati i dettagli dell'indagine che riguardano la tipologia di allevamento, il numero di animali, l'eventuale vaccinazione nei confronti di AMPV e il piano vaccinale applicato, frequenza e tipologia del campionamento per ogni gruppo analizzato.

Sono stati effettuati 2 studi longitudinali chiamati A e B e campionamenti singoli. Nello studio A tre gruppi sono stati oggetto di differenti piani vaccinali: sono stati somministrati rispettivamente 3 vaccini (2 vivi attenuati ed uno spento) al gruppo 1, 2 (vivi attenuati) al gruppo 2 e 1 (vivo attenuato) al gruppo 3. Tamponi rino-faringei per RT-PCR venivano eseguiti con frequenza di 2 volte a settimana e gli animali campionati erano sempre gli stessi. Lo studio B ha previsto il campionamento degli stessi animali sia in fase pollastra che in fase ovaiole dalla 11ma alla 24ma settimana di vita. Tutti i soggetti hanno ricevuto a 11 settimane di vita un vaccino vivo attenuato per AMPV, con metodo spray. Sono quindi stati effettuati due prelievi per esami sierologici, uno pre e uno post-vaccinazione. Per la fase ovaiole gli animali sono stati accasati in 3 allevamenti dove sono stati effettuati, una o due volte, campionamenti per diagnostica molecolare con RT-PCR e sierologia per AMPV. Inoltre l'indagine epidemiologica è stata estesa a 7 gruppi di pollastre e 5 gruppi di ovaiole nei quali è stato eseguito il campionamento, per diagnostica molecolare e/o sierologia, una sola volta.

C.2.1.1. Studio longitudinale n°1

Un allevamento di ovaiole, è stato oggetto di uno studio longitudinale che prevedeva un campionamento della durata di 22 settimane (dalla 20a alla 42a settimana di vita). Tale allevamento contava circa 70.000 animali, suddivisi in 3 capannoni e identificati come gruppo 1, 2, 3, ciascuno di circa 23.000 capi. I gruppi sin dalla fase pollastra sono stati oggetto di differenti piani vaccinali: sono stati somministrati rispettivamente 3 vaccini (2 vivi attenuati ed uno spento) al gruppo 1, 2 (vivi attenuati) al gruppo 2 e 1 (vivo attenuato) al gruppo 3. Tamponi rino-faringei per RT-PCR venivano eseguiti con frequenza di 2 volte a settimana e gli animali campionati erano sempre gli stessi. I dettagli relativi ai piani vaccinali ed al campionamento sono riportati nella tabella C.1.

C.2.1.2. Studio longitudinale n°2

È stato inoltre effettuato un secondo studio longitudinale che, rispetto al primo, ha previsto il campionamento degli stessi animali sia in fase pollastra che in fase ovaiole. Qui tutti i soggetti hanno ricevuto a 11 settimane di vita un vaccino vivo attenuato per AMPV, con metodo spray. Sono quindi stati effettuati due prelievi per esami sierologici, uno pre e uno post-vaccinazione. Le pollastre provenienti dal suddetto allevamento sono state successivamente accasate in tre allevamenti di ovaiole. In questa seconda fase sono stati eseguiti ulteriori prelievi di sangue e raccolti tamponi rinofaringei. I dettagli dello studio sono schematizzati nella tabella C.1.

C.2.1.3. CAMPIONAMENTI SINGOLI

Gli altri allevamenti oggetto dell'indagine sono stati campionati una sola volta. I dettagli sono descritti nella tabella C.1.

C.2.1.4. CAMPIONAMENTO

Considerando che l'infezione ha una morbilità che facilmente raggiunge il 100% (Stuart, 1989) e quindi prevalenze attese sicuramente superiori al 30%, e che la popolazione di ciascun gruppo era di minimo 10.000 soggetti, 10 campioni per gruppo erano sufficienti per evidenziare l'infezione con un livello di confidenza del 99% (Martin *et al.*, 1987). Dagli animali di ciascun gruppo sono stati raccolti tamponi rinofaringei per RT-PCR e/o campioni di sangue per l'esame sierologico per AMPV mediante ELISA, in numero di 10 per tipo. I primi venivano processati in pool. Il campionamento è stato effettuato oltre che dal gruppo di ricerca anche dal personale tecnico aziendale, adeguatamente addestrato. Questo era anche tenuto a comunicarci, o tramite la scheda di allevamento, oppure con semplici comunicazioni orali, eventuali manifestazioni sintomatologiche osservate nel gruppo, sia respiratorie che produttive o di altra natura, ma anche problematiche gestionali o riscontri rilevati in seguito a sopralluoghi sul posto. In alcuni casi è stato possibile entrare in possesso dei dati produttivi dell'allevamento.

C.2.1.4.1. Tamponi rinofaringei

I tamponi rinofaringei erano eseguiti penetrando nelle cavità nasali tramite la fessura palatina, quindi aderendo al faringe con movimenti rotatori. I tamponi erano quindi 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 dove venivano stoccati a temperatura ambiente.

C.2.1.4.2. Prelievi di sangue

I prelievi di sangue venivano eseguiti dalla vena cutanea ulnare e il sangue prelevato era posto in provette siliconate e mantenuto a temperatura ambiente sino a formazione e retrazione del coagulo.

Tabella C.1: Dettagli dei campionamenti e dei piani vaccinali

	Allevamento/Gruppo (numero di animali)	VACCINAZIONE per AMPV (settimane di vita)	RT-PCR e SIEROLOGIA
STUDIO LONGITUDINALE A (Ovaiola)	A/1 (23,000) Gabbia	<ul style="list-style-type: none"> Vivo attenuato spray (9)* Inattivato # (15) Vivo attenuato in acqua da bere (19) 	RT-PCR 2 volte la settimana a partire dalla 20ma sino alla 42ma settimana di età.
	A/2 (23,000) Gabbia	<ul style="list-style-type: none"> Vivo attenuato spray (9) Vivo attenuato in acqua da bere (19) 	
	A/3 (23,000) Gabbia	<ul style="list-style-type: none"> Vivo attenuato in acqua da bere (19) 	
STUDIO LONGITUDINALE B (da Pollastra ¥ a Ovaiola)	B/4 (13,000) a Terra	Vivo attenuato spray (11)	ELISA (s 11, 14, 20, 24§) RT-PCR (s 20, 24§)
	B/5 (13,000) a Terra		
	B/6 (30,000) Gabbia		
	B/7 (10,000) a Terra		
	B/8 (10,000) a Terra		
CAMPIONAMENTI SINGOLI (Pollastra)	9 (60,000) Gabbia	n.e.	ELISA (16)
	10 (75,000) Gabbia	n.e.	ELISA, RT-PCR (16)
	11 (75,000) Gabbia	n.e.	ELISA, RT-PCR (16)
	12 (66,000) Gabbia	n.e.	ELISA (14); RT-PCR (15)
	13 (66,000) Gabbia	n.e.	ELISA (14); RT-PCR (15)
	14 (85,000) Gabbia	n.e.	ELISA (13); RT-PCR (14)
	15 (20,000) a Terra	Vivo attenuato in acqua da bere (9)	RT-PCR(16)
CAMPIONAMENTI SINGOLI (Ovaiola)	16 (50,000) a Terra	Vivo attenuato spray (15)	RT-PCR (33) ELISA (34)
	17 (60,000) a Terra	n.e.	RT-PCR (17); ELISA (18),
	18 (25,000) Gabbia	n.e.	ELISA, RT-PCR (23)
	19 (40,000) a Terra	n.e.	ELISA, RT-PCR (23)

()* = settimane di età; n.e. = non eseguito; § = solo il gruppo B/4 and B/5; # = vaccino tetravalente inattivato, include antigeni per AMPV, ND (Newcastle Disease), BI (Infectious bronchitis) EDS (Egg Drop Syndrome); ¥ = Pollastre allevate in gabbia, unico gruppo di 120.000 animali

C.2.2. DIAGNOSTICA MOLECOLARE MEDIANTE RT NESTED PCR SOTTOTIPO A E B SPECIFICA PER DIAGNOSI E TIPIZZAZIONE DI AMPV

Per evidenziare e nel contempo tipizzare AMPV da tamponi rinofaringei è stata impiegata la RT-Nested PCR descritta da Naylor *et al.* (1997a) e Cavanagh *et al.* (1999), disegnata sulle sequenze del gene che codifica per la proteina G (Juhász e Easton, 1994), in grado di differenziare i sottotipo A e B. A questo protocollo è stata apportata una lieve modifica: è stato utilizzato l'oligonucleotide Gstart+ (5'- CAAGTATCCAGATGGGGTC -3') (Naylor, comunicazione personale) al posto del primer senso G1+.

C.2.2.1. Estrazione dell'RNA virale

L'estrazione di RNA dai tamponi rinofaringei si basa sul protocollo descritto al paragrafo A.2.1.2.3.1. Una modifica è rappresentata dalle modalità di estrazione dalla matrice tampone rinofaringeo come di seguito riportato:

Estrazione dell'RNA dai tamponi rinofaringei

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

- Si versava 1 ml di Solution D in una provetta acido resistente con tappo a vite, possibilmente DNAsi e RNAsi free.
- Si immergevano i tamponi, per 1-2 secondi, uno per volta, nella Solution D.
- Si reimmergevano i tamponi una seconda volta e per un tempo maggiore avendo cura di comprimerli accuratamente sulla parete della provetta.
- Il campione (Solution D) veniva posto a -80°C per almeno due ore o a -20°C per tutta la notte.
- 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 (Sodium acetate, Cat. N. S-7545, SIGMA®) a pH 4,1; 520 µl di Fenolcloroformio (Phenol:Chloroform 5:1, Acid-equilibrated pH 4.7, Cat. N. P1944, SIGMA®), quindi aggiunti 400 µl del campione in esame.
- La provetta veniva vortexata per 5-10 sec. e successivamente centrifugata a 13.000 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 tutta la notte.
- Il campione, dopo essere stato rimosso dal freezer, veniva centrifugato a 13.000 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 (etanolo 100%) e lasciato asciugare per 10 minuti. Il precipitato risospeso in 20 µl di una soluzione costituita da: 1 µl di DTT (in dotazione con SuperScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase, Cat. N. 18064-014, Invitrogen™) (0,1 M), 0,5 µl di RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Cat. N. N2111, Promega) (5U) e 18,5 µl di H₂O per biologia molecolare (Water, Cat. N. W4502, SIGMA®), veniva poi utilizzato nella reazione di retrotrascrizione.

C.2.2.2. Retrotrascrizione (RT)

Per la reazione di retrotrascrizione dell'RNA a DNA veniva preparata una mix di reazione di volume finale di 5 µl costituita da: 1 µl di Buffer 5X; 0,5 µl di DTT (0,1 M); 0,25 µl di dNTP (100 mM dNTP Set, PCR Grade, Cat. N. 10297-018 Invitrogen™) (10 mM); 2,125 µl di H₂O per biologia molecolare (Water, Cat. N. W4502, SIGMA®); 0,125 µl di RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Cat. N. N2111, Promega) (5U); 0,25 µl di Reverse Transcriptase (SuperScript™ II RNase H- Reverse Transcriptase, Cat. N. 18064-014, Invitrogen™) (50 U) e 0,75 µl di oligonucleotide G6- (10 pmol/µl). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una

goccia di olio minerale (Mineral oil, Cat. N. M-8410, SIGMA®) e 0,5µl dell'RNA risospeso. La reazione era ottenuta tramite incubazione in termociclatore per 60 minuti a 42°C e per 5 minuti a 94°C.

C.2.2.3. 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 per la seconda amplificazione, nella quale vengono utilizzati oligonucleotidi interni rispetto alla precedente. Nel protocollo da noi utilizzato (Figura 10), 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 Pneumovirus aviari sottotipo A e B. I 3 primers per la PCR 2 sono in grado di evidenziare e differenziare APV-A e APV-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 cDNA di 268 bp, e l'altro specifico per il sottotipo B (G9+B) in grado di generare un cDNA di 361 bp.

PCR 1

Per la PCR 1, del volume finale di 25 µl, è stata utilizzata la seguente mix: 2,5 µl di 10X Buffer, 1,75 µl di MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP (100 mM dNTP Set, PCR Grade, Cat. N. 10297-018 Invitrogen™) (10 mM), 18,5 µl di H₂O per biologia molecolare (Water, Cat. N. W4502, SIGMA®) e 0,5 µl (10 pmol/µl) di ciascun primer (Gstart+ e G6-) e 0,25 µl di Taq (Taq DNA Polymerase in Storage Buffer A, Cat. N. M1861, Promega®) (5 u/µl). A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (Mineral oil, Cat. N. M-8410, SIGMA®) e 0,5 µl 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.

PCR 2

Per la PCR 2 veniva utilizzata una mix identica a quella della PCR1 ad esclusione della quantità di H₂O (18 µl) e dei primers utilizzati (G8+A, G9+B, G5-). A tale mix venivano aggiunti 0,5µl 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 dell'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 (ΦX174 RF DNA/*Hae III* Fragments, Cat. N. 15611-015, Invitrogen).

C.2.3. SIEROLOGIA

C.2.3.1. Preparazione sieri

I campioni di sangue dopo il prelievo venivano tenuti a temperatura ambiente fino a coagulazione e retrazione del coagulo. Il siero era quindi raccolto e centrifugato a 1600 rpm alla temperatura di +20°C per 20 minuti. Dopo questa prima centrifugazione, che determinava la sedimentazione dei globuli rossi eventualmente presenti, il campione o veniva raccolto e stoccato o, se necessario, sottoposto a ulteriore centrifugazione con le medesime modalità. I sieri venivano stoccati a temperatura di -20°C per poi essere sottoposti al test ELISA.

C.2.3.2. ELISA

Per gli esami sierologici è stato utilizzato il kit ELISA Flockchek* APV Ab prodotto dalla IDEXX Laboratories, in grado di evidenziare anticorpi specifici per AMPV sottotipo A, B e C sia nei sieri di pollo che di tacchino. Il kit utilizza un sistema diretto quantitativo che si basa sul riconoscimento dell'antigene di Metapneumovirus aviare, adsorbito alla piastra, da parte degli anticorpi specifici del siero analizzato.

C.2.3.2.1. Modalità di esecuzione del test

Per l'esecuzione del test ELISA sono state seguite le istruzioni della casa produttrice.

C.2.3.2.2. Lettura della densità ottica allo spettrofotometro

La lettura della densità ottica veniva effettuata mediante lo spettrofotometro Multiskan EX per micropiastre con filtro di 650 nm.

C.2.3.2.3. Calcolo e interpretazione dei risultati

Perché i risultati siano validi, la differenza fra la media dei controlli positivi (PCx) e la media dei controlli negativi (NCx) deve essere più grande di 0,075. La media dell'assorbanza dei controlli negativi, inoltre, deve essere pari o inferiore a 0,150. La presenza o assenza di anticorpi per AMPV è determinata dal valore dell'assorbanza A(650) del campione in esame, rispetto al controllo positivo. I titoli vengono calcolati utilizzando le seguenti equazioni:

- media dei controlli negativi (NCx)

$$(NCx) = \frac{(NC1A_{650}) + (NC2A_{650})}{2}$$

- media dei controlli positivi (PCx)

$$(PCx) = \frac{(PC1A_{650}) + (PC2A_{650})}{2}$$

- S/P ratio

$$\frac{(\text{valore del campione} - NCx)}{(PCx - NCx)}$$

- Titolo

$$\text{antilog}_{10}(1,09(\log_{10} S/P) + 3,36)$$

I campioni con una S/P ratio uguale o inferiore a 0,2 (Titolo 396) devono essere considerati negativi. Al contrario campioni con una S/P ratio maggiore di 0,2 vengono considerati positivi. Il kit non permette di discriminare fra anticorpi di origine vaccinale o da infezione di campo. 4 gruppi di sieri sono stati processati presso laboratori esterni con un Kit ELISA per AMPV qualitativo.

C.3. RISULTATI

C.3.1. Studio longitudinale A

Nella tabella C.2 sono riportati i risultati degli esami di RT-PCR per AMPV dello studio longitudinale A. È stato evidenziato AMPV sottotipo B in tutti e tre i gruppi. Più precisamente il gruppo 1 è risultato positivo alla 20ma settimana, il gruppo 2 alla 20ma ed alla 32ma settimana, mentre il gruppo 3 ha mostrato tre positività: due nella 25ma settimana e un alla 26ma settimana.

Tabella C.2: Risultati dello studio longitudinale A.

Età in settimane	FASE OVAIOLA		
	Gruppo A/1	Gruppo A/2	Gruppo A/3
20	+B	+B	-
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	++B
26	-	-	+B
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
30	-	-	-
31	-	-	-
32	-	+B	-
33	-	-	-
34	-	-	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	-	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	-	-
41	-	-	-
42	-	-	-

+B positività per AMPV sottotipo B
- risultato negativo

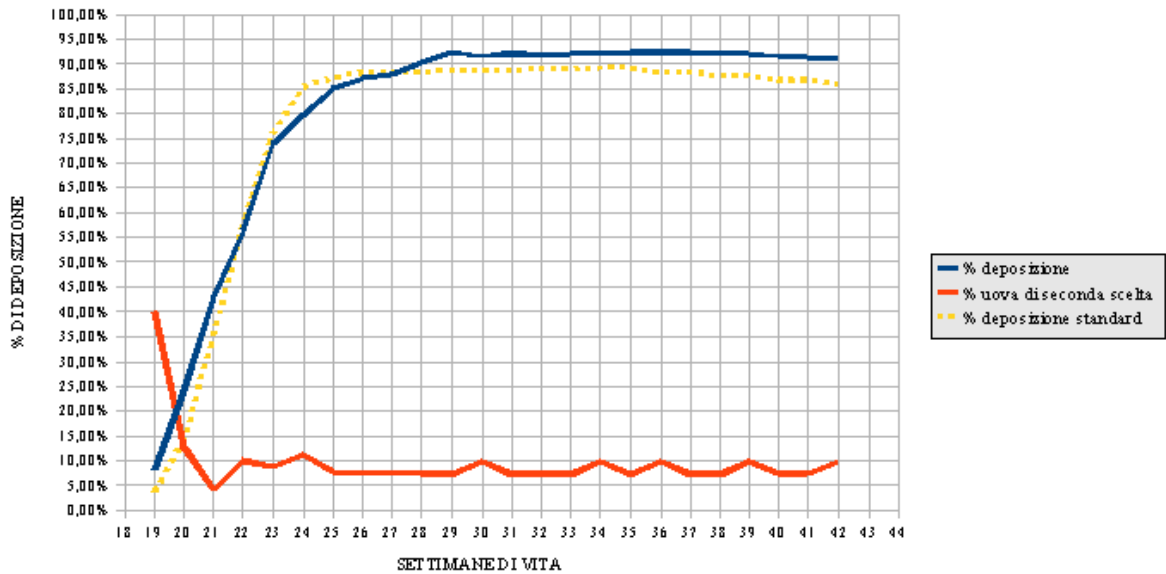


Figura C.1: dati produttivi complessivi dell'allevamento A.

Per questo studio, inoltre, sono stati raccolti i dati produttivi dell'allevamento, in particolare ci riferiamo alla % di deposizione ed alla % di uova di seconda scelta (Figura C.1). Purtroppo è pratica comune in condizione di campo raccogliere tali valori sul totale dell'allevamento, per cui nella figura 2 sono riportati i valori complessivi dell'allevamento e non dei singoli gruppi. Complessivamente tali dati si mostrano in linea con le aspettative produttive, anche se si nota un leggero ritardo nel raggiungimento del picco di deposizione. Tuttavia l'allevatore ha osservato alcune differenze fra i gruppi che poi sono state riassorbite in un risultato produttivo complessivo in linea con gli standard di razza. E' stato riferito che il gruppo 1 in particolare non ha mai raggiunto gli stessi livelli produttivi degli altri gruppi poiché ha manifestato alla 25a settimana un calo produttivo con presenza di uova con alterazioni della qualità del guscio. Inoltre questi animali mostravano un maggior grado di disomogeneità, in termini di peso, fra gabbia e gabbia, nonostante al momento dell'accasamento fossero abbastanza uniformi. Nonostante non previsto dalla indagine risulta utile a questo punto segnalare che in questo periodo è stata evidenziata mediante RT-PCR, eseguita presso un laboratorio esterno, una positività per il Coronavirus della Bronchite Infettiva (IBV).

C.3.2. Studio longitudinale B

Nella tabella C.3 sono riportati i risultati degli esami condotti nello studio longitudinale B. Al primo campionamento della fase pollastra (prevaccinazione) gli animali sono risultati negativi sierologicamente per AMPV. Al campionamento effettuato 3 settimane dopo la vaccinazione si è riscontrato un primo rialzo anticorpale. Dopo l'accasamento, indipendentemente dalla località di destinazione, tutti i gruppi di ovaiole hanno mostrato un ulteriore rialzo anticorpale accompagnato in alcuni casi dalla evidenziazione di AMPV alla RT-PCR, in un caso, B/4, anche per un intervallo di tempo piuttosto lungo (4 settimane).

Tabella C.3: Risultati dello studio longitudinale B.

FASE POLLASTRA											
Età in settimane					ELISA						
11					-						
14					+						
FASE OVAIOLA											
Gruppo											
		B/4		B/5		B/6		B/7		B/8	
Età in settimane	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR	ELISA	
20	+B	+	+B	+	+B	+	-	+	-	+	
24	+B	+	-	+	n.e.						

+B positività per AMPV sottotipo B; - risultato negativo; n.e.: non eseguito

C.3.3. Campionamenti singoli

C.3.3.1. Allevamenti di pollastre

Nella tabella C.4 sono riportati i risultati dei campionamenti singoli condotti negli allevamenti in fase pollastra. Tutti i gruppi di pollastre campionati sono risultati positivi alla sierologia, sia essa eseguita presso il Dipartimento che presso laboratori esterni. Nel primo caso è stato possibile osservare, essendo l'ELISA quantitativa, titoli particolarmente elevati. Alla RT-PCR si è riscontrata per contro una sola positività per AMPV, sottotipo B, nel gruppo 12. Tutti gli altri gruppi sono risultati negativi, anche probabilmente in relazione al fatto che i tamponi rinofaringei sono stati eseguiti in un momento successivo alla sierologia.

Tabella C.4: Risultati dei campionamenti singoli negli allevamenti in fase pollastra.

Allevamento/gruppo	Sieri (età in settimane)	ELISA	Tamponi Rinofringei (età in settimane)	RT-PCR
9	16	+	n.e.	n.e.
10	16	+	16	-
11	16	+	16	-
12	14	+	15	+B
13	14	+	15	-
14	13	+	14	-
15	n.e.	n.e.	16	-

n.e.: non eseguito; - : negativo; +B: positivo AMPV sottotipo B

C.3.3.2. Allevamenti di ovaiole

Nella tabella C.5 sono riportati i risultati dei campionamenti singoli condotti negli allevamenti in fase ovaiole. I gruppi sono risultati tutti positivi alla sierologia con

alti livelli anticorpali indicanti una probabile precedente esposizione ad AMPV, Ciò è riferibile anche al gruppo 16, i cui animali erano stati vaccinati per AMPV a 15 settimane di vita. L'entità del titolo suggerisce infatti il passaggio di un virus di campo. Tutti i campioni sono, invece, risultati negativi per AMPV alla RT-PCR al momenti del campionamento.

Tabella C.5: Risultati dei campionamenti singoli in fase ovaioia.

Allevamento/gruppo	Sieri (età in settimane)	ELISA	Tamponi Rinofringei (età in settimane)	RT-PCR
16	34	+	33	-
17	18	+	17	-
18	23	+	23	-
19	23	+	23	-
n.e.: non eseguito; - : negativo; +B: positivo AMPV/B				

C.4. DISCUSSIONI

L'indagine epidemiologica condotta negli allevamenti di galline ovaiole, sia in fase pollastra che in fase ovaiole propriamente detta, ha portato all'osservazione di un'elevata diffusione dell'infezione da Metapneumovirus aviare nella seppur limitata zona campionata. Tutti i ceppi AMPV evidenziati appartenevano al sottotipo B, e ciò concorda con i dati ad oggi disponibili sulla situazione epidemiologica nazionale indicanti la prevalenza netta di questo sottotipo (Catelli *et al.*, 2004a, 2004b; Catelli, 2006) rispetto al sottotipo A pur presente in Italia (Cecchinato *et al.*, 2003; Catelli, 2006). Va inoltre sottolineato come gli allevamenti considerati erano situati in regioni quali Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna, in cui l'infezione da AMPV è endemica negli allevamenti di polli da carne e soprattutto nel tacchino, specie particolarmente sensibile al Metapneumovirus aviare.

In nessun caso si è evidenziato il virus in concomitanza di sintomatologia respiratoria, questo dato concorda con quanto già riportato in bibliografia riguardo alla possibilità che negli animali in deposizione la forma respiratoria possa passare inosservata (Cook *et al.*, 1988)

In sole due evenienze è stato possibile correlare la presenza dell'infezione da AMPV a cali dell'ovodeposizione ed alterazioni della qualità dell'uovo. In ambedue i casi il calo era del 10%, in linea con quanto riportato in bibliografia (Zanella, 2005). Mentre le alterazioni dell'ovodeposizione osservate nel gruppo A/1 sono chiaramente da correlare al passaggio del virus della Bronchite Infettiva; non si è infatti rilevata la presenza di AMPV nel gruppo, e l'esame di RT-PCR per IBV, è risultata positiva.

Degni di nota sono i risultati ottenuti dallo studio longitudinale A, in cui nonostante non sia stato possibile valutare in termini clinici l'efficacia dei singoli piani vaccinali, poiché i dati produttivi erano relativi a tutto l'allevamento e non ai singoli capannoni nei quali erano applicati, e per il passaggio del virus della BI, si possono delineare alcune considerazioni sull'efficacia degli stessi nel prevenire l'infezione virale. Il gruppo A/1, che ha ricevuto un piano vaccinale con 3 interventi (Tabella C.1) sembra essere stato protetto dall'infezione di campo poiché l'unica positività alla RT-PCR si è riscontrata al 1° campionamento che corrispondeva a soli 10 giorni dall'ultima vaccinazione con vaccino vivo attenuato. Ciò fa ipotizzare che tale positività possa essere dovuta proprio al ceppo vaccinale che può persistere in campo per diverse settimane (Catelli *et al.*, 2006; Catelli dati non pubblicati). La conferma definitiva di tale ipotesi necessiterà di studi più approfonditi sulla sequenza nucleotidica del ceppo evidenziato, in regioni genomiche marker per il vaccino.

Tale positività è stata rilevata anche nel gruppo A/2, in cui si è poi evidenziata l'infezione da ceppo verosimilmente di campo a 13 settimane (alla 32^a settimana di vita) dall'ultima vaccinazione.

Nel gruppo A/3, vaccinato una sola volta con vaccino vivo attenuato, si è verificata infezione a solo 6 settimane dalla vaccinazione. In questo caso l'infezione ha mostrato una persistenza maggiore; il virus infatti è stato evidenziato in 3 campionamenti successivi, cioè per un arco di tempo di circa 10 giorni (compreso fra la 25a e 26a settimana di vita).

Quindi il piano vaccinale che prevedeva tre interventi (A/1) fra cui uno con vaccino inattivato, sembra avere protetto effettivamente dall'infezione confermando dati già riportati da altri autori. Il vaccino spento è infatti essenziale per la protezione degli animali in deposizione (Cook *et al.*, 2000; Hess *et al.*, 2004; Sugiyama *et al.*, 2006). Il piano vaccinale applicato al gruppo A/2 ha sì indotto una protezione ma non di durata sufficiente a coprire adeguatamente l'intero ciclo produttivo. La vaccinazione con un unico vaccino vivo attenuato (A/3) invece è risultata insufficiente, considerando la precoce comparsa dell'infezione ed il lungo periodo di eliminazione virale.

Considerazioni aggiuntive ed a supporto di quanto già esposto possono essere fatte a commento dei dati ottenuti nello studio longitudinale B. In questo studio pollastre negative sierologicamente, vaccinate con vaccino vivo attenuato, hanno successivamente tutte mostrato l'infezione da AMPV entro la 20a settimana di vita, in coincidenza con l'evento stressante dell'accasamento e della entrata in deposizione. La vaccinazione singola con vaccino vivo si è in questo caso rivelata inefficace a proteggere oltre che dalla infezione anche dal calo dell'ovodeposizione. Resta tuttavia da chiarire se gli animali si siano infettati poco prima dell'accasamento, oppure siano venuti in contatto col virus successivamente.

I campionamenti singoli hanno evidenziato come molti gruppi si infettino in fase pollastra, senza mostrare sintomi clinici evidenti, arrivando così sieropositivi alla deposizione. Interessante sarà indagare se il contatto con il virus in tale fase protegga da ulteriori infezioni nella futura vita produttiva.

Lo studio riportato in questa tesi fornisce dati preliminari ma unici disponibili in Italia sulla diffusione e dinamica delle infezioni da AMPV nel settore produttivo dell'uovo da consumo. Studi ulteriori saranno necessari per ampliare l'area d'indagine e delineare con chiarezza l'importanza dell'infezione nel determinare cali della ovodeposizione, e porre le basi per definire piani vaccinali efficaci.

CONCLUSIONI

Gli studi riportati nella presente tesi approfondiscono alcune delle problematiche legate alla vaccinazione per AMPV nell'allevamento del tacchino da carne e della gallina ovaiole per la produzione di uova da consumo, in Italia.

Nel primo è stata dimostrata quale causa di focolai precoci di infezione anche in animali vaccinati, per la prima volta, con studi di campo e sperimentali, la riacquisizione di patogenicità di un vaccino vivo attenuato AMPV sottotipo B.

Questa evidenza si aggiunge a quanto già riportate in precedenza per un vaccino vivo attenuato sottotipo A (Catelli *et al.*, 2006).

Nel secondo studio è stato dimostrato che vaccini tornati a virulenza, in particolare il sottotipo A, possono persistere nell'ambiente d'allevamento anche a lungo e causare focolai tardivi di malattia in animali vaccinati con sottotipo eterologo.

L'ultimo studio ha messo in evidenza un'elevata diffusione dell'infezione da AMPV sottotipo B in allevamenti di galline ovaiole per la produzione di uova da consumo, e permesso di fare alcune considerazioni sull'efficacia di alcuni piani vaccinali, concludendo che solo il piano che prevede anche l'impiego del vaccino inattivato è in grado di proteggere completamente dall'infezione. Al momento questi dati, benché preliminari, sono gli unici disponibili in Italia sulla diffusione e controllo di AMPV in questo settore produttivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmadian G, Chambers P, Easton AJ. 1999. *Detection and characterization of proteins encoded by the second ORF of the M2 gene of pneumoviruses*. Journal of General Virology, 80 (Pt 8):2011-6.
2. Al-Afaleq A.I., Jones R.C., Homeida A.M., Savage C.E., 2002. *In vitro Effect of some Steroidal Hormones on the Replication of Avian Pneumovirus*. Journal of Veterinary Medicine B, 49:193-196.
3. 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.
4. Ali A. e Reynolds D.L., 2000. *A multiplex reverse transcription–polymerase chain reaction assay for Newcastle disease virus and avian pneumovirus (Colorado strain)*. Avian Diseases, 2000 Oct-Dec; 44(4): 938-943.
5. Alkhalaf A.N., Ward L.A., Dearth R.N., Saif Y.M., 2002. *Pathogenicity, trasmissibility, and tissue distribution of avian pneumovirus turkey poults*. Avian Diseases, 46(3): 650-659.
6. Alvarez R, Seal B.S., 2005. *Identification of a truncated nucleoprotein in avian metapneumovirus-infected cells encoded by a second AUG, in-frame to the full-length gene*. Virology Journal, 12;2:31.
7. Alvarez R., Lwamba H.M., Kapczynski D.R., Njenga M.K., Seal BS. 2003. *Nucleotide 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
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Anonimo, 1985. *Turkey rhinotracheitis of unknown aetiology in England and Wales*. Veterinary Record, 117: 653-654.
12. Anonimo, 1996. *Stato sanitario dell'allevamento avicolo nelle varie regioni italiane nel 1995*. Zootecnica International suppl. (6): 8-12.
13. Aung Y.H., 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.

14. Banet-Noach C, Simanov L, Perk S., 2005. *Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens*. Avian Pathology, 34(3): 220-226.
15. 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.
16. Barr J., Chambers P., Harriott P., Pringle C.R., Easton A.J., 1994. *Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames*. Journal of Virology, 68(8):5330-4.
17. Bastien N, Normand S, Taylor T, Ward D, Peret TC, Boivin G, Anderson LJ, Li Y., 2003. *Sequence analysis of the N, P, M and F genes of Canadian human metapneumovirus strains*. Virus Research, 93(1):51-62.
18. Baxter-Jones C, Cook JK, Frazier JA, Grant M, Jones RC, Mockett AP, Wilding GP., 1987. *Close relationship between TRT virus isolates*. Veterinary Records, 120(23):562.
19. 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.
20. Baxter-Jones C., Wilding G.P., Grant M., 1986. *Immunofluorescence as a potential diagnostic method for turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, 119: 600-601.
21. 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.
22. Bayon-Auboyer M-H., Jestin V., Toquin D., Cherbonnel M., Eterradossi 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.
23. Bell I.G. e Alexander D.J., 1990. *Failure to detect antibody to turkey rhinotracheitis in Australian poultry flocks*. Australian Veterinary Record, 67: 232-233.
24. 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.
25. 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.
26. Bhella D., Ralph A., Murphy L.B., Yeo R.P., 2002. *Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae*. Journal of General Virology, 83(Pt 8):1831-9.
27. Bidin Z., Stanisic Z., Curic S., Rusac I., Mikec M., 1990. *Rhinotracheitis in turkeys. Clinical picture and specific serum antibody findings in the first report case of the disease in Yugoslavia*. Vet Arhiv, 60: 59-67.
28. Botchkov Y., Borisov A., Irza V., Okovyntaya 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 September 2002, 175.

29. 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.
30. Brown PA, Bonci M, Ricchizzi E, Jones RC, Naylor CJ, 2009. *Identification of two regions within the subtype A avian metapneumovirus fusion protein (amino acids 211-310 and 336-479) recognized by neutralizing antibodies*. *Virus Research*, 146(1-2):13-8. Epub 2009 Aug 29.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. Capua I. e Lavazza A. 1999. *Principali patologie presenti nell'allevamento avicolo durante il 1998*. *La Selezione Veterinaria* (8-9): 533-541.
37. Capua I., 1998. *Relazione sullo stato sanitario dell'allevamento avicolo nel 1997*. *La Selezione Veterinaria* (8-9): 545-548.
38. Capua I., Norci C., Casaccia C., Weiss C., 1995. *Risultati di un programma di monitoraggio sierologico su un allevamento di tacchini da riproduzione*. *Zootecnica International* supp (2): 60-64.
39. Catelli E, Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Brown PA, Naylor CJ, 2010. *Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity*. *Vaccine*, 28: 916-921.
40. Catelli E. e Lavazza A., 2000. *Relazione sullo stato sanitario dell'allevamento avicolo nel 2000*. *La Selezione Veterinaria* 11: 963-970.
41. 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, 7 giugno 2006, Bologna, Italia, 19-23*.
42. 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, 3-4 ottobre 2002, Forli Italia. Large Animals Review, 8 (6):109-110.

43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Cavanagh D. e Barrett T., 1988. *Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus*. Virus Research, 11: 241-256.
48. 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.
49. 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.
50. Cecchinato M, Catelli E, Lupini C, Ricchizzi E, Clubbe J, Naylor C.J., 2009. *Evidence of AMPV attachment protein evolution coincident with mass live vaccine introduction in Italy*. VI International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and Complicating Pathogens. Rauschholzhausen, Germany, 14-17 Giugno 2009. WB Lauferweiler Verlag, Giessen, Germany, 2009, pp.278-284.
51. Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Sperati Ruffoni L., Pesente P., Piccirillo A., Franciosi C., Naylor C.J. 2007. *Sequence analysis of fusion (F) and attachment (G) protein genes of Avian Metapneumovirus strains isolated in Italy*. 15th World Veterinary Poultry Congress Abstract Book p 87. World Veterinary Poultry Congress, Beijing, China, 10-15 September 2007.
52. 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, 2-3 ottobre 2003, Forli, Italia. Large Animal Review, 9(6): 121-122.
53. 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.
54. Chacón J.L., Brandão P.E., Buim M., Villarreal L., Ferreira A.J., 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

55. 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.
56. Chary P., Rautenschlein S., Njenga M.K., Sharma J.M., 2002. *Pathogenic and immunosuppressive effects of avian pneumovirus in turkeys*. *Avian Diseases* 2000; 46:153-161.
57. Chettle N.J. e Wyeth P.J., 1988. *Turkey rhinotracheitis: detection of antibodies using an ELISA test*. *British Veterinary Journal*, 144: 282-287.
58. Collins M.S. e Gough R.E., 1988. *Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis*. *Journal of General Virology*, 69: 909-916.
59. 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.
60. 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.
61. Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR., 1995. *Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 5;92(25):11563-7.
62. Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H., 1996. *Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 9;93(1):81-5.
63. Cook J.K.A. e Cavanagh D., 2002. *Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses)*. *Avian Pathology*, 31: 117-132.
64. Cook J.K.A., 2000a. *Avian Pneumovirus infections of turkeys and chickens*. *The Veterinary Journal*, 160: 118-125.
65. Cook J.K.A., 2000b. *Avian Rhinotracheitis*. *Revue scientifique technique*. Office International des Epizooties, 19(2): 602-613.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. Cook J.K.A., Ellis M.M., Huggins M.B., 1991. *The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria*. *Avian Pathology*, 20: 155-166.

70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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 1990, 54-57.
77. Dalton J.R.F. e Cserep T., 2004. *The response of pheasant (Phasianus colchicus) to Pneumovirus (TRT) vaccine.* Proceedings of 4th International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germania, 20-23 giugno 2004, 343-349.
78. 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.
79. De Graaf M., Osterhaus ADM, Fouchier RAM, Holmes E.C., 2008. *Evolutionary dynamics of human and avian metapneumovirus.* Journal of General Virology; 89: 2933-2942.
80. 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, 24-27 April 1991, 158-161.
81. 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.* Proceeding of 4th International Symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry, Rauschholzhausen, Germania, 20-23 giugno 2004, 282-286.
82. Drouin P., Toux J.Y., Picault J.P., 1985. *Le syndrome infectieux de la grosse tete chez l'espèce poule.* L'aviculteur; 460:93-96.
83. Dupuy LC, Dobson S, Bitko V, Barik S., 1999. *Casein kinase 2-mediated*

phosphorylation of respiratory syncytial virus phosphoprotein P is essential for the transcription elongation activity of the viral polymerase; phosphorylation by casein kinase I occurs mainly at Ser(215) and is without effect. Journal of Virology, 73(10):8384-92.

84. Easton A.J., Domachowske J.B., Rosenberg H.F., 2004. *Animal Pneumoviruses: Molecular Genetics and Pathogenesis.* Clinical Microbiology Reviews, 17: 390-412.
85. 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.
86. 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, Germany, 14-17 June 2000, 214-217.
87. 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.
88. Fabris G. e D'Aprile P.N., 1990. *Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio.* Zootecnica International (6), 36-40.
89. 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.
90. 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, Germany, 19-21 February 1998, 107-119.
91. Fearn R., Collins P.L., 1999. *Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription.* Journal of Virology, 73(7):5852-64.
92. Feldman SA, Crim RL, Audet SA, Beeler JA., 2001. *Human respiratory syncytial virus surface glycoproteins F, G and SH form an oligomeric complex.* Archives of virology, 146(12):2369-83.
93. Felsenstein, J. 1985. *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.* Evolution. 39, 783-791.
94. Felsenstein, J. 1989. *PHYLIP: Phylogenetic Inference Package (Version 3.2).* Cladistics 5, 164-166.
95. 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, Istanbul, Turkey, 22-26 August 2005, 275.
96. 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.
97. Ganapathy K., Jones R.C., Bradbury J.M., 1998. *Pathogenicity of in vivo-passaged*

Mycoplasma imitans in turkey poult in single infections and dual infections with rhinotracheitis virus. Avian Pathology, 27: 80-89.

98. 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.
99. García-Barreno B., Delgado T., Melero J.A., 1996. Identification of protein regions involved in the interaction of human respiratory syncytial virus phosphoprotein and nucleoprotein: significance for nucleocapsid assembly and formation of cytoplasmic inclusions. Journal of Virology, 70(2):801-8.
100. Gharaibeh S.M., Algharaibeh G.R., 2007. Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan. Poultry Science, 86(8):1677-81.
101. Ghildyal R., Mills J., Murray M., Vardaxis N., Meanger J., 2002. Respiratory syncytial virus matrix protein associates with nucleocapsids in infected cells. Journal of General Virology, 83(Pt 4):753-7.
102. Giraud P., Bennejean G., Guittet M., Toquin D., 1986. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. Veterinary Record, 119: 606-607.
103. 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, California, USA, 29 February-2 March, 37: 61-62.
104. Giraud P., Le Gros F.X., Guittet M., Bouquet J.F., Toquen 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.
105. 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.
106. 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.
107. Gough R.E., Drury S.E., Aldous E., Laing P.W., 2001. Isolation and identification of avian pneumovirus from pheasant. Veterinary Record, 149: 312.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. Guionie O., Toquin D., Sellal E., Bouley S., Zwingelstein F., Allée 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.
112. 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.
113. Hafez H.M. e Arns C., 1991. *Disinfection trials on turkey rhinotracheitis*. Proceedings of 24th World Veterinary Congress, Rio de Janeiro, Brazil, 295.
114. Hafez H.M. e Lohren U., 1990. *Swollen head syndrome: clinical observations and examination in West Germany*. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 97: 322-324.
115. Hafez H.M. e Woernle H., 1989. *Turkey rhinotracheitis, serological results in Baden-Württemberg*. Tierärztliche Umschau, 44: 369-376.
116. Hafez H.M., 1992. *Comparative investigation of different turkey rhinotracheitis (TRT) virus isolates from different countries*. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 99: 486-488.
117. Hafez H.M., 1993. *The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review*. Arch.Geflugelk., 53(4):181-185.
118. 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.
119. 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, Rauschholzhausen, 15-18 giugno 1998, 23-25.
120. 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.
121. Horner R., Parker M., Ratcliffe C., 2003. *A serological survey of wild helmeted guineafowl (Numidia Meleagris) in KwaZuluNatal Province, South Africa*. Proceedings of 13th Congress of the World Veterinary Poultry Association, Denver, Colorado, USA, 19-23 July 2003, 85-86.
122. 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, 24-27 April 1991, 126-127.
123. Jing L., Cook J.K.A., Brow 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.
124. 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.
125. 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.

126. 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 Academy of Sciences, USA, 84: 5625-29.
127. Jones R.C., 1996. *Avian Pneumovirus infection: questions still unanswered*. Avian Pathology 25: 639-648.
128. 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
129. 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.
130. Jones R.C., F., Pattison M., Alexander D., Faragher T., 2002. *Pneumovirinae*. In: Jordan. Poultry Diseases, 5th edition, 272-281.
131. 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, Berlin, Germany, 14-17 June 2000, 244-248.
132. Jones R.C., Kherha 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, Germany, 15-18 June 1998, 97-105.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. Juhasz K, Easton A.J., 1994. *Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups*. Journal of General Virology, 75 (Pt 11):2873-80.
137. 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): 1376-83.
138. Kherha 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.
139. 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.

140. 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.
141. 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.
142. Krempl C, Murphy BR, Collins PL., 2002. *Recombinant respiratory syncytial virus with the G and F genes shifted to the promoter-proximal positions*. Journal of Virology, 76(23):11931-42.
143. Lambden P.R., 1985. *Nucleotide sequence of the respiratory syncytial virus phosphoprotein gene*. Journal of General Virology, 66 (Pt 7):1607-12.
144. Lantos C., 1990. *Actual problems of poultry hygenes*. Baromfitenyesztes-es-Feldogozas, 37: 54-58.
145. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P. Chenna, R., McGettigan1, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics. 23, 2947-2948.
146. 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.
147. 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.
148. Levine S, Klaiber-Franco R, Paradiso PR., 1987. *Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus*. Journal of General Virology, 68 (Pt 9):2521-4.
149. 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.
150. 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.
151. 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.
152. 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.
153. Ling R. e Pringle C.R., 1988. *Turkey rhinotracheitis virus: in vivo and in vitro polypeptide synthesis*. Journal of General Virology, 69: 917-923.
154. 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.

155. 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.
156. 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.
157. 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.
158. 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.
159. 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.
160. 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.
161. 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.
162. 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.
163. 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.
164. 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.
165. Martin S.W., Meek A.H., Willeberg P., 1987. *Veterinary Epidemiology*, Iowe State University press/ames , 36-37.
166. Massi P., 1997. *Riepilogo delle principali patologie aviarie osservate nel corso del 1996 nelle diverse regioni italiane*. La Selezione Veterinaria (8-9): 537-541.
167. 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, University of California, Davis, California, USA, 24-26 March 2001, 76-77.
168. McDougall J.S. e Cook J.K.A., 1986. *Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations*. Veterinary Record, 118: 206-207.

169. 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, Sacramento, California, USA, 8-10 March 2003, 38-39.
170. Meini A., 1996. *Infezione da pneumovirus: rinotracheite del tacchino e swollen head sindrome del pollo*. *Zootecnica international*, 45-50.
171. 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.
172. 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.
173. Morley A.J. e Thompson D.K., 1984. *Swollen head syndrome in broiler chickens*. *Avian Disease*, 28: 238-243.
174. 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.
175. Munir S, Kapur V., 2003. *Transcriptional analysis of the response of poultry species to respiratory pathogens*. *Poult Science*, 82(6):885-92.
176. Nagaraja K., Velayudhan B., Lopez V. C., Halvorson D. A., Bennet R. C., McComb B., Shaw D., 2005. *Pathogenesis of avian pneumovirus infections infetion in two-week-old turkeys*. Proceedings of the 54th Western Poultry Disease Conference, , Vancouver, B.C., Canada, 25-27 April 2005, 49-51.
177. Nagaraja K.V., Shin H. J., Njenga M., Shaw D., Halvorson D.A., 2001. *Host range and Epidemiology of avian Pneumovirus infection*. Proceedings of the 50th Western Poultry Disease Conference, University of California, Davis, CA, USA, 24-26 March 2001, 80-81.
178. Naylor C., Shaw K., Britton P., Cavanagh D., 1997a. *Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain*. *Avian Pathology*, 26: 327-338.
179. Naylor C.J. e Jones R.C., 1993. *Turkey rhinotracheitis virus: a review*. *Veterinary Bulletin*, 63: 439-449.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. 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.

184. 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, Berlin, Germany, 15-18 May 2002, 151-153.
185. 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.
186. Njenga K., Lwamba H., Bennett R., Halvorson D., 2007. *Epidemiologia dei pneumovirus aviari nel Midwest degli Stati Uniti*. Zootecnia International, 3:52-55.
187. Njenga K., Lwamba H., Seal B.S., 2003. *Metapneumoviruses in birds and humans*. Virus Research, 91:163-169
188. 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.
189. O'Brien J.D.P., 1985. *Swollen head syndrome in broiler breeders*. Veterinary Record, 117: 619-620.
190. 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.
191. O'Loan C.J., Allan G.M., 1990. *The detection of turkey rhinotracheitis virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin-biotin-immunoperoxidase method*. Avian Pathology, 19:401-407.
192. Owoade A.A., Ducatez M.F., Hübschen J.M., Sausy A., Chen H., Guan Y., Muller C.P., 2008. *Avian metapneumovirus subtype A in China and subtypes A and B in Nigeria*. Avian Disease; 52(3):502-506.
193. Parry JE, Shirodaria PV, Pringle CR., 1979. *Pneumoviruses: the cell surface of lytically and persistently infected cells*. Journal of General Virology, 44(2):479-91.
194. 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.
195. 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.
196. 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.
197. 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..
198. 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.
199. Picault J. P, 1988. *La rinotracheite infettiva (RTI oTRT) e la sindrome infettiva da rigonfiamento della testa (SIGT o SHS)*. XXVII Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, 15-16 settembre 1988, Forlì, Italia.

200. 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.
201. Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N., 1990. *Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains*. Journal of General Virology, 71 (Pt 5):1153-62.
202. Polland B., Hafez H.M., Vasicek L., 1992. *Turkey rhinotracheitis in Austria*. Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 3: 30-74.
203. Pringle C.R., 1998. *Virus taxonomy - San Diego 1998*. Archives of Virology, 143: 1449-1459.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. Reed L.J. e Muench H., 1938. *A simple method for estimating fifty percent endpoints*. American Journal of Hygiene, 27: 493-497.
208. 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, Berlin, Germany, 19-21 June 2008, 171-175.
209. 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, Las Vegas, Nevada, 26-29 March 2007, 25-28.
210. Sarakbi T., 1989. *Head swelling syndrome, a new problem for Yemen*. Poultry, Misset February/March, 17.
211. Satake M., Elango N., Venkatesan S. 1984. *Sequence analysis of the respiratory syncytial virus phosphoprotein gene*. Journal of Virology 52(3):991-4.
212. Schiricke E., 1984. *La rhinotrachéite de la dinde: historique, évolution, symptômes et lésions moyens de lutte*. L'aviculteur, 442: 91-98.
213. Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M. & von Haeseler, A. 2002. *TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing*. Bioinformatics. 18, 502-504.
214. 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.

215. 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.
216. 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.
217. 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, 190.
218. Sharma J.M., Chary P., Heather Gerbyshak-Szudy, 2002. *Immunopathogenesis of avian pneumovirus of turkeys*. *Proceedings of 4th International Symposium on Turkey Diseases*, Berlin, Germany, 15-18 May 2002, 40.
219. 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.
220. 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.
221. 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.
222. 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 6 T.C. Grey, Butterworth, London, 217-224.
223. Sugiyama M., Koimaru H., Shiba M., Ono E., Nagata T., Ito T., 2006. *Drop Egg production in chickens by experimental infection with avian metapneumovirus strain PLE8T1 derived from swollen head syndrome and the application to evaluate vaccine*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(8): 783-787.
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.
225. 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.
226. Tarpey I. e Huggins M.B., 2007. *Onset of immunity following in ovo delivery of avian metapneumovirus vaccines*. *Veterinary Microbiology*, 124:134-139.
227. 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.
228. Teng M.N. and Collins P. L., 1998. *Identification of the respiratory syncytial virus proteins required for formation and passage of helper-dependent infectious particles*. *Journal of Virology*, 72:5707–5716.

229. Teng MN, Collins PL., 1998. *Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein*. Journal of Virology, 73(1):466-73.
230. Tiwari A., Patnayak D.P., Chander Y., Parsad M., Goyal S.M., 2006a. *Survival of two avian respiratory viruses on porous and nonporous surfaces*. Avian Diseases, 50: 284-287.
231. 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.
232. 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.
233. 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.
234. 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.
235. 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.
236. 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, 20-24 June 2006, 70-76.
237. 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.
238. Toro H., Hidalgo H., Ibanèz M., Hafez H.M., 1998. *Serologic Evidence of Pneumovirus in Chile*. Avian Diseases, 42: 815-817.
239. 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.
240. Turpin E., 2003. *Identification and Sequence Analysis of Avian Metapneumovirus in Wild Birds Outside of Endemic Areas*. Proceedings of 13th Congress of the World Veterinary Poultry Association, Denver, Colorado, USA 19-23 July 2003, 68.
241. 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.
242. 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.

243. 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.
244. Valarcher F., Schelcher F., Bourhy H. 2000. *Evolution of Bovine Respiratory Syncytial Virus*. Journal of Virology, 74: 10714-10728.
245. 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.
246. 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.
247. 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.
248. 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.
249. 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.
250. Van Loock M., Loods K., Van de Zande S., Van Heerden M., Nauwynck H., Goddeeris B.M., D. Vanrompay, 2006. *Pathogenic interactions between Chlamydophyla psittaci and avian pneumovirus infections in turkeys*. Veterinary Microbiology, 112:53-63.
251. 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.
252. 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.
253. Villareal L.Y.B., Brandao P.E., Chacon J.L., Assayag M.S., Maiorka P.C., Raffi P., Saidenberg 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.
254. 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, California, USA, 29 February-2 March, 37:67-69.
255. Welchman Dde B, Bradbury JM, Cavanagh D, Aebischer NJ., 2002. *Infectious agents associated with respiratory disease in pheasants*. Veterinary Records, 150(21):658-64.
256. 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, Berlin, Germany, 14-17 June 2000, 249-255.
257. 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.

258. Wray L. e Davies H., 2002. *Enterobacteriaceae*. In: Jordan F., Pattison M., Alexander D., Faragher T., Poultry Diseases, 5th edition, 95-131.
259. Wyeth P., 1990. *Turkey rhinotracheitis and swollen head syndrome cause heavy loss*. Poultry Digest, 16-21.
260. Wyeth P., Gough R.E., Chettle N., Eddy R., 1986. *Preliminary observations on a virus associated with turkey rhinotracheitis*. Veterinary Record, 119: 139.
261. 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.
262. Yu Q., Davis P.J., Barrett T., Binns M.M., Boursnell 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.
263. 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: 1355-63.
264. Zanella A., 2005. *Patologie virali quali cause di calo dell'ovodeposizione*. XLIV Convegno Annuale della Società Italiana di Patologia Aviaria, Forlì, 29-30 settembre 2005, 20-24.
265. Zimmer G., Budz L., Herrler G., 2001. *Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences*. Journal of Biological Chemistry, 276:31642–31650.
266. Zimmer G., Conzelmann K. K., Herrler G., 2002. *Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture*. Journal of Virology, 76:9218–9224.