

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Animale Protezione e Salute (MAPS)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Veterinarie

CICLO: XIX ciclo

“Interazione tra *Metapneumovirus* aviare e *Mycoplasma synoviae*
in *broiler* inoculati sperimentalmente e studio del comportamento
di un vaccino per *Mycoplasma synoviae* in polli riproduttori
pesanti”

Coordinatore: Prof. Alessandro Zotti

Supervisore: Dott. Mattia Cecchinato

Dottoranda : Dott.ssa Maria Luisa Moronato

Matricola n. 1084838

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Scopo della tesi	3
1.2. I micoplasmi	5
1.2.1 <i>Mycoplasma Synoviae</i>	7
1.3 <i>Metapneumovirus aviare</i>	13
1.4 Bibliografia	21
2. PARTE A: Interazione tra <i>Metapneumovirus aviare</i> (aMPV) e <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS) in <i>broiler</i> inoculati sperimentalmente: studio della diffusione dei patogeni tramite <i>real-time</i> PCR	
2.1 Introduzione	31
2.2 Scopo del lavoro	35
2.3 Materiali e metodi	36
2.4 Risultati	48
2.5 Discussione	68
2.6 Appendici	75
2.7 Bibliografia	84

3. PARTE B: Application of different laboratory techniques to monitor the behaviour of a *Mycoplasma synoviae* vaccine (MS-H) in broiler breeders (*Articolo scientifico inviato alla rivista BMC Veterinary Research - in corso di revisione*)

Abstract	94
Background	96
Materials and methods	97
Results	101
Discussion	104
Conclusions	108
Declarations	109
References	110
4. CONCLUSIONI	115

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni l'avicoltura nazionale e globale sono andate incontro ad un notevole aumento produttivo che si è progressivamente sviluppato grazie alle nuove tecnologie d'allevamento, alla selezione genetica e all'aumento della richiesta di carni bianche da parte del consumatore. Questo ha comportato conseguentemente l'industrializzazione della filiera avicola, che si è principalmente strutturata, nel nostro Paese, all'interno di aree ad elevata densità animale (DPPA-*Densely Populated Poultry Area*), come le regioni a più elevata vocazione zootecnica: Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna. L'esponentiale incremento del comparto avicolo ha comportato la necessità di acquisire un nuovo approccio diretto alla gestione sanitaria degli allevamenti, che deve tenere conto di numerosi aspetti, quali la selezione genetica degli animali, la loro alimentazione, il benessere animale, la profilassi vaccinale, le misure di biosicurezza, la terapia farmacologica, ecc.

Le patologie respiratorie rappresentano un grave problema dell'allevamento avicolo industriale in quanto causano importanti perdite economiche, dovute, non solo alla possibile mortalità, ma anche alla minore produttività dei capi (abbassamento dell'indice di conversione alimentare, calo del numero di uova deposte, aumento degli scarti al macello, ecc.) e all'aumento dei costi terapeutici e di disinfezione (Van Empel e Hafez, 1999).

Queste patologie ritrovano frequentemente un'eziologia multifattoriale e possono essere dovute ad agenti batterici (*Avibacterium paragallinarum*, *Bordetella avium*, *Chlamydia psittaci*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma meleagridis*, *Mycoplasma synoviae*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*), virali (*Adenovirus*, *Coronavirus*, *Herpesvirus*, *Influenzavirus*, *Avian Metapneumovirus*, *Paramyxovirus*) o

funginei (*Aspergillus fumigatus*), da soli o in combinazione (Van Empel e Hafez, 1999; Glisson, 1998; Kleven, 1998). Le condizioni ambientali dell'allevamento ed in particolare temperatura, umidità, concentrazione di ammoniaca, densità degli animali, presenza di concomitanti condizioni stressanti, possono contribuire allo sviluppo o all'aggravamento della malattia (Marien, 2007). Inoltre, la frequente presenza di forme patologiche multifattoriali può complicare l'interpretazione del quadro, rendendo spesso difficile identificare il reale ruolo degli agenti infettivi coinvolti e il tipo di relazione tra essi. Infine, nell'ambito delle forme respiratorie è spesso l'agente ad eziologia virale a svolgere il ruolo di "apripista" nei confronti di infezioni batteriche secondarie. Tuttavia in alcuni casi, è invece l'infezione batterica a stabilirsi in primo luogo e a favorire la colonizzazione dell'ospite da parte di altri microrganismi quali ad esempio *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* ed *Escherichia coli*.

1.1 SCOPO DELLA TESI

Scopo del presente lavoro è approfondire le conoscenze riguardanti due patogeni, *Mycoplasma synoviae* (MS) e *Metapneumovirus aviare* (aMPV), responsabili di malattia respiratoria nel pollame, che negli ultimi anni sembrano essere maggiormente presenti nel territorio nazionale (Tucciarone *et al.*, 2017; Catania *et al.*, 2016b) e nei confronti dei quali è aumentata l'attenzione sia da parte dei veterinari di campo, che della comunità scientifica. La rilevanza di tali agenti è stata inoltre avvalorata dalle perdite economiche correlate all'infezione, che possono essere ancora più importanti nel caso di infezioni concomitanti ed in settori ad elevata produzione come quello del pollo da carne.

Vista pertanto la rilevanza epidemiologica di tali agenti eziologici, la scarsità di informazioni riguardanti la capacità di aMPV di dare malattia nel pollo da carne e la loro possibile interazione in tale specie, ci si è quindi proposti di indagare nella parte A del presente lavoro di tesi:

- la riproducibilità dell'infezione da aMPV nel *broiler*;
- la diffusione di ambedue i patogeni nell'ospite, infettato singolarmente o con entrambi gli agenti eziologici;
- se tra i due microrganismi può stabilirsi un'interazione di tipo sinergico in animali infettati sperimentalmente.

In secondo luogo (parte B), con l'obiettivo di ampliare le conoscenze riguardanti i sistemi di controllo disponibili nei confronti dell'infezione da MS, si è voluto monitorare, tramite uno studio

longitudinale di campo, il comportamento di un vaccino vivo attenuato per MS (MS-H) in polli riproduttori, approfondendo conseguentemente l'applicabilità di alcuni sistemi di genotipizzazione descritti in letteratura nella possibile discriminazione tra ceppi vaccinali e ceppi di campo .

1.2 I MICOPLASMI

I micoplasmata sono le più piccole cellule procariotiche capaci di vita autonoma. Sono annoverati all'interno della classe Mollicutes, ordine Mycoplasmatales, phylum Tenericutes. La classe dei Mollicutes è composta da 8 generi batterici, dei quali solo *Mycoplasma*, *Ureaplasma* e *Acholeplasma* sono stati descritti come patogeni per uomo e animali (Tabella 1).

Classe Mollicutes				
Ordine Mycoplasmatales	Ordine Entoplasmatales		Ordine Acholeplasmatales	Ordine Anaeroplasmatales
Famiglia Mycoplasmataceae	Famiglia Entomoplasmataceae	Famiglia Spiroplasmataceae	Famiglia Acholeplasmataceae	Famiglia Anaeroplasmataceae
Genere: <i>Mycoplasma</i> <i>Ureaplasma</i>	Genere: <i>Entomoplasma</i> <i>Mesoplasma</i>	Genere: <i>Spiroplasma</i>	Genere: <i>Acholeplasma</i>	Genere: <i>Asteroleplasma</i> <i>Anaeroplasma</i>

Tabella 1. Classificazione tassonomica dei Mollicutes.

I micoplasmata possiedono diverse caratteristiche che li rendono peculiari se paragonati alle altre specie di Eubatteri. Innanzi tutto, come la denominazione *Mollicutes* (“*mollis-cutis*”) suggerisce, sono micro-organismi privi di una parete batterica propriamente detta, che si vede sostituita da una membrana plasmatica costituita da proteine, glicoproteine, glicolipidi e fosfolipidi. La mancanza di parete batterica fa sì che i micoplasmata siano organismi plastici e pleomorfi e naturalmente resistenti

ad alcuni antibiotici, quali cefalosporine e penicilline. I micoplasmi presentano, inoltre, piccole dimensioni (0,3 μm circa) e forma varia (coccica, a spirale, filamentosa, ad anello). Sono definiti *fastidious microorganisms* nella crescita *in vitro*, per la quale sono necessari terreni con requisiti specifici (colesterolo, NAD, penicilline), particolari condizioni di coltivazione (37°C, 5% CO₂) (Markey *et al.*, 2013), tempi lunghi per l'isolamento e personale tecnico specializzato. La crescita in terreno solido agarizzato è contraddistinta dalla presenza di colonie visualizzabili al microscopio ottico invertito dall'aspetto caratteristico, definito a "uovo fritto" (Figura 1).

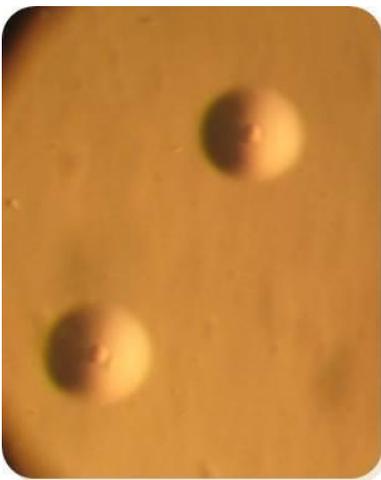


Figura 1. Aspetto caratteristico “ad uovo fritto” di colonie di *Mycoplasma spp.* in terreno solido.

I micoplasmi sono inoltre dotati di un piccolo genoma di circa 600kb, che, nonostante garantisca limitate capacità metaboliche e biosintetiche, ha permesso comunque di riconoscerli come “*fast evolving microorganism*” (Delaney *et al.*, 2012).

I micoplasmi di interesse veterinario sono distribuiti in tutto il mondo, come saprofiti o parassiti/opportunisti di diverse specie animali, per i quali tendono ad essere specie-specifici. Sia le specie di *Mycoplasma* patogene, che quelle non patogene possono essere riconosciute come commensali delle mucose del sistema respiratorio, gastro-enterico, genito-urinario, ecc. (Markey *et al.*, 2013).

Le micoplasmosi aviari riconoscono numerosi agenti eziologici, dal ruolo più o meno patogeno, che possono colpire sia specie avicole industriali, che specie minori.

Le più importanti micoplasmosi aviari, per impatto economico produttivo e forme patologiche, sono causate da *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* e *Mycoplasma meleagridis* (Kempf, 2015; OIE Terrestrial Manual 2.3.5, 2008).

1.2.1 *Mycoplasma synoviae*

Mycoplasma synoviae (MS) è un importante patogeno delle specie avicoli industriali, responsabile di notevoli perdite economiche in allevamento (Ogino *et al.*, 2011). Nonostante sia stato storicamente considerato “secondo” rispetto a *Mycoplasma gallisepticum* per patogenicità, prevalenza ed impatto sul territorio, nell’ultimo decennio la sua presenza è notevolmente incrementata, sia a livello nazionale, che europeo (Landman *et al.*, 2014).

L’infezione da MS è stata descritta in diverse specie avicole; tra queste il pollo e il tacchino rappresentano l’ospite naturale e sono in genere colpiti tra la 4^a-16^a settimana e la 10^a-24^a rispettivamente (Ferguson-Noel e Noormohammadi , 2013). MS è stato inoltre identificato in specie avicole minori quali anatra, oca, quaglia, fagiano, faraona e riportato in uccelli ornamentali, come il fenicottero (Catania *et al.*, 2016a).

Nel pollo e nel tacchino l’infezione da MS, che si caratterizza per bassa mortalità ed elevata morbilità, decorre generalmente in forma asintomatica.

La presenza di *Mycoplasma synoviae* associata alla concomitante infezione da parte di altri agenti eziologici può determinare un aggravamento delle condizioni cliniche. In particolare, l’associazione con infezioni virali da *Infectious Bronchitis Virus* (IBV) e da *Newcastle Disease Virus* (NDV) e infezioni batteriche quali quelle sostenute da *E. coli*, possono essere correlate ad un quadro

patologico più grave (Kleven, 1998; Ferguson-Noel e Normoohammadi, 2013; Landman e Feberwee, 2004). Un esempio è quello rappresentato dalla grave aerosacculite (“*Air sac disease*”) riportata in casi di infezione da *Mycoplasma gallisepticum*/*Mycoplasma synoviae*, IBV/NDV ed *E. coli* (Ley, 2008). La colonizzazione dei tratti superiori dell’apparato respiratorio può essere associata a quadri più complessi nel caso di concomitanti infezioni batteriche (*E. coli*) o virali (Malattia di Newcastle, Bronchite Infettiva, Metapneumovirus aviare), comportando quindi sintomatologia evidente e lesioni ai distretti più profondi, come i sacchi aerei (Ferguson-Noel e Noormohammadi, 2013).

La diffusione sistemica del patogeno è correlata all’insorgenza di forme patologiche articolari nel pollo e nel tacchino (soprattutto a carico di garretto e cuscinetto plantare), caratterizzate dal coinvolgimento della membrana sinoviale di articolazioni e tendini, con accumulo di essudato limpido e filante nelle forme non complicate.

Recentemente, l’infezione sistemica da MS è stata inoltre associata ad una sindrome tipica della gallina ovaioia definita *Eggshell Apex Abnormalities – EAA* (Feberwee *et al.*, 2009; Catania *et al.*, 2010, Catania *et al.*, 2016b).

In caso di EAA, le uova presentano una riduzione del peso medio ed evidentemente alterate sulla loro superficie esterna, che mostra una colorazione più marcata ad un apice del guscio (Figura 2). La parete risulta assottigliata e quindi più fragile, comportando un aumento nel numero di uova rotte e delle attività di pulizia svolte nelle varie fasi di allevamento (Catania *et al.*, 2016b).



Figura 2. Alterazioni caratteristiche del guscio e fragilità delle uova in corso di EAA (*Eggshell Apex Abnormalities*).

Le conseguenze economiche correlate all'infezione da MS possono quindi essere ingenti e legate non solo alle attività di profilassi e terapia, ma anche al calo dell'incremento ponderale, alla riduzione della produzione zootecnica e all'aumento degli scarti in sede di macellazione.

La diagnosi di MS può essere di tipo diretto tramite isolamento colturale dell'agente e sua successiva identificazione (ad esempio grazie a 16s-rDNA-PCR-DGGE o tecniche di immunofluorescenza) o con l'ausilio di metodi di natura biomolecolare quali PCR specie-specifiche. La diagnosi di tipo indiretto si avvale principalmente di metodi sierologici quali ELISA, SAR e HI, che routinariamente trovano una vasta applicazione per lo svolgimento delle attività di monitoraggio dei gruppi avicoli. Tali metodiche laboratoristiche, rapide ed economiche, possono comunque risultare non prive di difetti di specificità.

Ad oggi, non è presente un sistema di classificazione universalmente riconosciuto dei diversi ceppi di MS, ma in bibliografia sono stati ampiamente trattati il gene *vlhA* e, secondariamente, il gene *obg*. Il gene *vlhA* (*variable lipoprotein haemagglutinin A*) codifica per un emoagglutinina di membrana, che è articolata in un segmento trans-membrana ed uno extra-membrana, coinvolta

nell'adesione alla cellula ospite, nell'attività di agglutinazione dei globuli rossi e nella stimolazione del sistema immunitario umorale dell'ospite (Noormohammadi *et al.*, 2007a). L'analisi di tale gene è stata descritta nel dettaglio da Bencina *et al.* (2001) ed in seguito da Hammond *et al.* (2010), che, focalizzandosi su porzioni geniche non del tutto sovrapponibili, hanno rispettivamente sviluppato una classificazione in “tipo”, identificato da lettere maiuscole (A, B, C, D, E, F) e in “gruppo”, segnalato da numeri arabi (1, 2, 3, 8, ecc.). El Gazzar *et al.* (2012) hanno in seguito proposto una rivisitazione del sistema di classificazione precedentemente descritto da Hammond *et al.* (2009), concentrandosi su un segmento più ampio di tale *gene*. Numerosi altri studi hanno interessato il gene *vlhA* con l'obiettivo di valutarne non solo le caratteristiche molecolari e funzionali, ma anche le possibili applicazioni di tipo diagnostico o di monitoraggio sul campo ed in particolare la potenziale funzione discriminativa tra ceppo di campo e ceppo vaccinale (Harada *et al.*, 2009; Bayatzadeh *et al.*, 2014). Un'altra classificazione dei diversi ceppi di MS si basa sul gene *obg*, che codifica per una *GTP-binding protein* appartenente alla famiglia delle *GTPasi* e coinvolta in processi cellulari essenziali, come trascrizione e sintesi proteica. In bibliografia, la valutazione di specifiche mutazioni puntiformi a carico del gene *obg* è riportata come d'ausilio nella differenziazione tra un vaccino vivo attenuato denominato MSH, ceppi reisolati dal vaccino (distinti in termosensibili e non) e ceppi di campo (Shahid *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2014).

In virtù della capacità di questo microorganismo di trasmettersi non solo per via verticale, ma anche per via orizzontale, le attività dirette al controllo di MS sono molteplici. Un punto cardine è rappresentato dalla prevenzione, grazie allo sviluppo e al mantenimento di gruppi di riproduttori *Mycoplasma-free* (Kleven, 2008). Tale obiettivo può essere raggiunto con l'eliminazione di tutti i gruppi positivi e con l'applicazione di ferree misure di biosicurezza, le quali si rendono ancora più necessarie nel caso di zone *Densely Populated Poultry Areas* (DPPAs). Tuttavia, lo *stamping out* degli animali infetti presenta limitate possibilità di applicazione, se si considerata la prevalenza elevata del patogeno e i costi conseguenti all'eliminazione dei gruppi positivi. L'applicazione

sistematica di piani di monitoraggio risulta essenziale nel fornire una pronta diagnosi di *outbreak* e conseguentemente nella messa in atto di misure volte a contenere la diffusione del patogeno e di tipo terapeutico. Il trattamento farmacologico può rappresentare uno strumento efficace nel ridurre la trasmissione verticale, le manifestazioni cliniche e le lesioni macroscopicamente evidenti; in particolare trattamenti definiti “pulsati” si sono dimostrati efficaci nel controllo della diffusione di MS in gruppi di riproduttori (Gobbo *et al.*, 2016). Infine, la vaccinazione può essere un’opzione nel controllo di MS, soprattutto nel caso di prevalenza elevata del patogeno, di gruppi multi-età (Kleven, 2008) ed in funzione del contesto epidemiologico.

L’introduzione in commercio del vaccini vivo attenuato MS-H ha notevolmente stimolato la comunità scientifica internazionale nel valutarne efficacia, sicurezza ed applicabilità, che sono state trattate in diversi studi nella specie pollo (Noormohammadi *et al.*, 2003; Markham *et al.*, 1998a; Markham *et al.*, 1998b; Morrow *et al.*, 1998) e meno frequentemente nel tacchino (Noormohammadi *et al.*, 2007b). Feberwee *et al.* (2009) hanno invece valutato la possibile applicazione della vaccinazione nel controllo di EAA, evidenziando, in condizioni sperimentali, una buona, ma non completa, azione protettiva di MS-H, associata ad un’insorgenza ritardata di uova alterate. La disponibilità della vaccinazione per MS è sopraggiunta recentemente in Italia (2010) ed ad oggi è autorizzata solo in animali della specie pollo. La richiesta da parte del campo di disporre di strategie di controllo efficaci nei confronti di MS e l’introduzione della vaccinazione sul territorio nazionale hanno tuttavia messo in luce la necessità di ulteriori valutazioni inerenti il comportamento del vaccino nella popolazione ospite ed in particolare nel settore del pollo riproduttore ed, infine, di approfondire l’applicazione delle metodiche diagnostiche discriminative tra MS-H e ceppi di campo ad oggi disponibili. Proprio questi aspetti sono stati valutati nel presente lavoro di tesi (Parte B).

1.3 METAPNEUMOVIRUS AVIARE

Il *Metapneumovirus* aviare è l'agente della rinotracheite del tacchino, mentre nel pollo la presenza di tale microorganismo è stata associata, oltre ad una sitomatologia di tipo respiratorio, alla Sindrome della Testa Gonfia (SHS – *Swollen Head Syndrome*), che può svilupparsi nel caso di concomitanti infezioni batteriche secondarie.

Il *Metapneumovirus* aviare appartiene all'ordine Mononegavirales, famiglia dei *Pneumoviridae*, all'interno della quale sono annoverati due generi:

-Genere *Orthopneumovirus* nel quale si ritrovano il Virus Respiratorio Sinciziale umano (A2 e B1), quello bovino e il *Pneumovirus* del topo;

-Genere *Metapneumovirus* nel quale sono descritti il *Metapneumovirus* umano e quello aviare.

Il *Metapneumovirus* aviare è un virus a RNA a singolo filamento non segmentato e a polarità negativa, che in microscopia elettronica si caratterizza da elevato pleomorfismo con particelle virali generalmente di forma tondeggianti e dimensioni tra 80 e 200 nm, dotate di *envelope* esterno con *spikes* (Jones e Rautenschlein, 2013). Presenta un nucleocapside a simmetria elicoidale e non manifesta attività emoagglutinante (Buys *et al.*, 1989), né neuroaminidasi.

Tale virus presenta nove proteine strutturali: la nucleoproteina (N), la fosfoproteina (P), la proteina di matrice (M), la proteina di fusione (F), la seconda proteina di matrice (M2-1 e M2-2), la piccola proteina idrofobica (SH), la glicoproteina di superficie (G) e l'RNA polimerasi RNA-dipendente

(L) (Jones e Rautenschlein, 2013) (Figura 3). Ciascun gene codifica per una sola proteina, ad eccezione del gene M2, che codifica per due proteine di matrice, denominate M2-1 e M2-2.

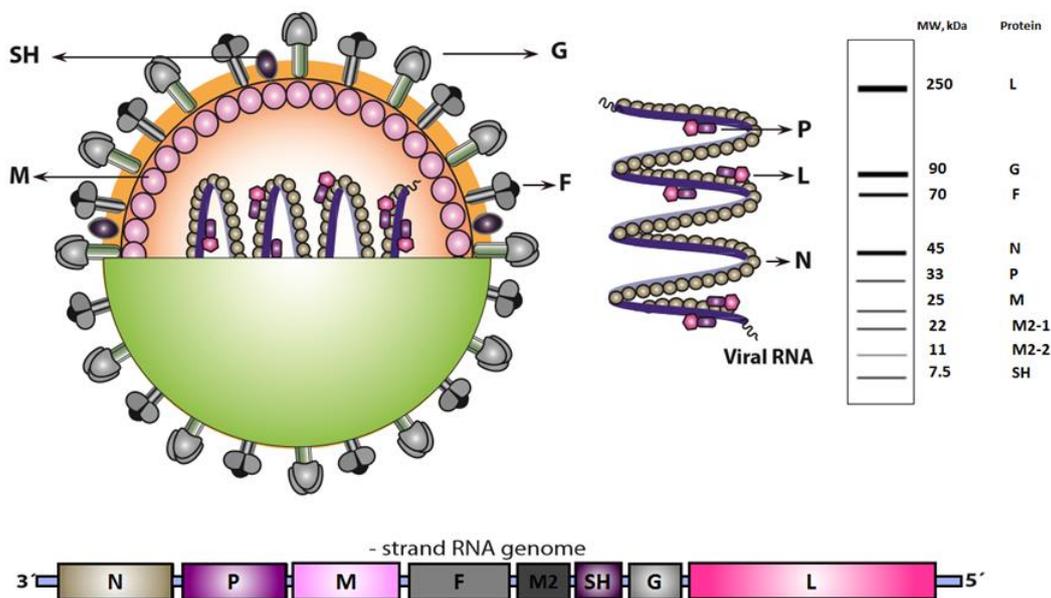


Figura 3. Rappresentazione schematica del *Metapneumovirus aviare* e della sua organizzazione genomica (figura tratta da *Mononegaviruses of Veterinary Importance*, vol.2: *Molecular Epidemiology and Control*, p. 131).

Diversi studi effettuati con la tecnica ELISA hanno dimostrato la presenza di un solo sierotipo correlato a questo virus (Cook *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1993); al contrario, l'analisi nucleotidica ed amminoacidica di alcune proteine virali di maggiore rilevanza antigenica, come la glicoproteina di superficie e la proteina di matrice, hanno messo in luce alcune differenze tra ceppi di *Metapneumovirus aviare* (Jones e Rautenschlein, 2013). L'analisi del segmento codificante per la glicoproteina G ha evidenziato una certa variabilità, permettendo la definizione, in prima istanza tra i ceppi europei, di due sottotipi virali: sottotipo A e B (Juhasz e Easton, 1994), che risultano i più diffusi e in grado di infettare sia il pollo che il tacchino. Sono stati inoltre descritti un sottotipo C, isolato per la prima volta in Colorado (Seal, 2000) ed in seguito riportato in Nord America, in Corea, in Francia e in Cina, che risulta filogeneticamente poco correlato al sottotipo A e B. Infine, è stato descritto un sottotipo D (Bayo-Auboyer *et al.*, 2000), identificato una sola volta in Francia nel

1985 e mai più riportato, che risulta separato dagli altri sottotipi da un punto di vista filogenetico, ma vicino all'A e B.

In seguito al primo caso descritto di *Metapneumovirus* aviare avvenuto negli anni 70 in Sud Africa, il virus si è diffuso ampiamente in tutti gli altri continenti ad eccezione dell'Oceania. In Italia, il *Metapneumovirus* aviare è stato identificato per la prima volta nel 1987 (Fabris e D'aprile, 1990) ed in seguito si è diffuso ampiamente nei territori a maggiore vocazione avicola in particolare Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna (Cecchinato *et al.*, 2013a). Il principale sottotipo di *Metapneumovirus* risulta essere tutt'oggi il B, mentre, in seguito alla sua prima segnalazione, il sottotipo A è più stato identificato solo in modo sporadico (Cecchinato *et al.*, 2013a) e il sequenziamento dei ceppi A circolanti nel nostro territorio ha evidenziato come questi fossero unicamente di derivazione vaccinale (Catelli *et al.*, 2006; Lupini *et al.*, 2011).

L'infezione da *Metapneumovirus* aviare è caratterizzata da elevata morbilità e mortalità occasionalmente elevata; la trasmissione avviene solitamente per via orizzontale, in particolare per contatto diretto tra animali infetti ed animali sensibili, mentre la possibile trasmissione per via verticale non è ad oggi stata dimostrata, nonostante l'identificazione del virus nel tratto riproduttivo di animali in ovodeposizione (Jones e Rautenschlein, 2013).

Gli ospiti naturali di *Metapneumovirus* sono il tacchino e il pollo, i quali possono essere colpiti a tutte le età. Il tacchino rappresenta tuttavia la specie più sensibile, nella quale il virus può determinare una malattia specifica denominata rinotracheite del tacchino; questa è dovuta ad infiammazione delle vie aeree superiori e si manifesta con starnuti, rantoli, scolo nasale, tosse, congiuntivite sierosa-schiumosa, movimenti del capo, riduzione dell'assunzione di alimento e rapida *restitutio ad integrum* (10-14 giorni) nelle forme non complicate (Cook, 2000). Nelle forme complicate da infezioni batteriche (ad es. *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Mycoplasma spp.*), (Marien, 2007; Cook, 2000), si può assistere a fenomeni di aerosacculite, peri-epatite, pericardite, ecc. con conseguente aumento della mortalità.

Nella specie pollo l'infezione decorre generalmente in forma asintomatica o come lieve forma respiratoria; in caso di altre infezioni batteriche concomitanti, generalmente *E. coli*, è stata correlata alla sindrome della testa gonfia o SHS – *Swollen Head Syndrome*, patologia ad eziologia multifattoriale, ancora oggi non completamente delucidata (Cook, 2000) seppur sia stata osservata per la prima volta in Sud Africa nel 1979 (Buys *et al.*, 1989; Pattison *et al.*, 1989). Nella sindrome della testa gonfia gli animali manifestano sintomi respiratori, gonfiore mono o bilaterale dei seni infra-orbitali, associato ad edema facciale che si estende diffusamente a carico della testa. Negli animali in attività riproduttiva, sia della specie pollo, che della specie tacchino, si può assistere, inoltre, ad un calo dell'ovodeposizione e ad un peggioramento della qualità delle uova, il cui guscio può mostrare segni di decolorazione (Etteradossi *et al.*, 2015). Le condizioni di allevamento, quali ventilazione, densità, qualità della lettiera, ecc., possono concorrere ad aggravare le condizioni sanitarie del gruppo.

Il *Metapneumovirus* è stato riscontrato in numerose altre specie aviari, tra cui faraona e fagiano domestico, per le quali è stata dimostrata la sensibilità all'infezione naturale e sperimentale; inoltre, è stata identificata la presenza dell'agente virale in diverse specie selvatiche quali anatra, oca, piccione, gabbiano e passero, ecc. (Lee *et al.*, 2007; Garaibeh *et al.*, 2012; Cecchinato *et al.*, 2016).

La comparsa del virus in sud Africa, Europa continentale, USA, Israele, Inghilterra ha suggerito il possibile ruolo degli uccelli migratori e selvatici nell'epidemiologia e diffusione di questo agente (Cecchinato *et al.*, 2016). Questa ipotesi è stata più ampiamente documentata in America, in cui il aMPV sottotipo C si ritrova nell'industria avicola del tacchino ed allo stesso tempo è stato identificato in uccelli selvatici (Bennet *et al.*, 2005; Cha *et al.*, 2013).

La diagnosi di aMPV può essere di tipo diretto o indiretto. La diagnosi basata unicamente sulla sintomatologia clinica non risulta particolarmente attendibile, viste le scarse manifestazioni sintomatologiche e la poca specificità dei segni clinici espressi in corso di infezione (Etteradossi *et al.*, 2015). Per il raggiungimento di una diagnosi di tipo diretto si può ricorrere all'isolamento in

uova embrionate di pollo o tacchino, in *tracheal organ coltures* (TOC) o in alcune linee cellulari (CEF, CEL, VERO). Le uova embrionate sono inoculate a 6 giorni e dopo 8 giorni si procede alla raccolta di sacco vitellino e liquido allantoideo; dopo due o tre passaggi si possono evidenziare emorragie embrionali o mortalità. Nel caso si utilizzino le TOC, i virus di sottotipo A e B si manifestano dopo 6-10 giorni dall'inoculo con attività di tipo ciliostatica (Jones e Rautenschlein, 2013). Nel caso di virus di sottotipo C, che non manifestano attività ciliostatica, per la propagazione *in vitro* si ricorre a substrati differenti, come uova embrionate o colture cellulari (Cook *et al.*, 1999). Bisogna tuttavia ricordare che la presenza dell'agente virale nell'ospite è limitata ad un breve intervallo di tempo in seguito ad infezione (fino a 6-7 giorni *post*-infezione), motivo per cui il campionamento per l'isolamento virale dovrebbe essere eseguito al momento di comparsa dei primi segni clinici o in soggetti che non mostrano evidenti segni clinici (Cook e Cavanagh, 2002); una volta che la sintomatologia si presenta conclamata, l'isolamento virale risulta estremamente difficile. La diagnosi può essere condotta tramite l'identificazione dell'agente infettivo con metodiche di natura biomolecolare quali RT-PCR e real-time RT-PCR, alle quali si associano elevata sensibilità e rapidità, se paragonate all'isolamento dell'agente (Cook e Cavanagh, 2002). In funzione del gene *target* sono state disegnate PCR di tipo genere-specifiche o sottotipo specifiche, che possono risultare di ausilio laboratoristico soprattutto in aree epidemiologiche in cui si riconoscono diversi sottotipi virali circolanti. Le prime RT-PCR hanno presentato come *target* dapprima il gene che codifica per la proteina F ed in seguito quelli codificanti per le proteine N e G (Bayo-Auboyer M.-H. *et al.*, 2000). Cecchinato *et al.* (2013b) e Franzo *et al.* (2014) hanno inoltre sviluppato due metodiche di RT-qPCR dirette all'amplificazione del gene SH con cui è possibile identificare, differenziare e quantificare sia il sottotipo A, sia il sottotipo B di aMPV. Infine, Cavanagh *et al.* (1999) e Listorti *et al.* (2014) hanno evidenziato alcune differenze nucleotidiche potenzialmente utili nella differenziazione tra ceppi di campo e ceppi vaccinali verso il sottotipo B tramite metodiche di PCR.

Per la diagnosi di tipo sierologico sono disponibili diverse metodiche, tra le quali test ELISA, immunofluorescenza e siero-neutralizzazione, che non sono d'ausilio nella distinzione tra ceppi di campo e ceppi vaccinali. Il test ELISA è quello più ampiamente utilizzato e diversi sono i kit commerciali ad oggi disponibili, che sono generalmente caratterizzati da elevata specificità e sensibilità variabile. Inoltre, i kit disponibili trovano buona applicazione nel caso di virus di sottotipo A e B, ma possono risultare carenti nel caso del sottotipo C per il quale è consigliato l'utilizzo del ceppo omologo (Cook e Cavanagh, 2002), mentre poche sono le informazioni relative al sottotipo D.

L'applicazione di buone misure di biosicurezza e il rispetto di elevati standard di *managment* aziendale risultano fattori determinanti nel controllo dell'infezione da aMPV (Cook *et al.*, 2000); in particolare le condizioni igieniche, la densità degli animali e i principali parametri ambientali possono incidere sensibilmente nel decorso della patologia e nelle conseguenti ripercussioni economiche, che possono a loro volta essere aggravate nel caso di concomitanti infezioni batteriche secondarie.

Un altro strumento applicabile per il controllo dell'infezione da aMPV e per la riduzione della circolazione virale è rappresentato dalla vaccinazione, che può variare in funzione principalmente della categoria produttiva e del contesto epidemiologico. Generalmente si prevede il solo utilizzo di vaccini vivi attenuati negli animali da carne (pollo e tacchino), a cui fa seguito la somministrazione di vaccini spenti nel caso di galline ovaiole e riproduttori. I vaccini inattivati, soprattutto in associazione ai vaccini vivi, potenziano la risposta immunitaria umorale che è coinvolta nella protezione dell'apparato riproduttore e di conseguenza svolge un ruolo rilevante nel contrastare il calo di ovodeposizione correlato all'infezione virale.

La vaccinazione può essere applicata anche nel caso di animali nati da madri immuni, in quanto la presenza di anticorpi materni, descritta fino alla terza settimana di età, non interferisce con l'attecchimento del vaccino (Naylor *et al.*, 2007). I vaccini vivi attenuati comportano una

stimolazione sia del sistema immunitario sistemico, che di quello locale (apparato respiratorio superiore). Le vie di somministrazione possono essere tramite goccia oculare, spray o in acqua di bevanda ed è stata dimostrata un'immunità di 14-22 settimane in condizioni sperimentali (Cecchinato *et al.*, 2016). La massima efficacia viene garantita tramite la vaccinazione con il ceppo omologo, tuttavia è presente una buona cross-protezione tra vaccini verso il sottotipo A e il B, che a loro volta garantiscono una buona attività anche nei confronti del sottotipo C, ma non viceversa.

Nonostante la vaccinazione venga riportata come uno strumento efficace nella protezione da infezione da *Metapneumovirus* nel tacchino e nel pollo (Cook, 2000), in Italia è stata segnalata una non completa copertura immunitaria dovuta ad evoluzione dei ceppi di campo (Cecchinato *et al.*, 2010; Catelli *et al.*, 2010) ed, inoltre, diversi studi presenti in bibliografia hanno dimostrato, in virtù dell'instabilità genetica dell'agente, la possibilità di un ritorno alla virulenza di ceppi vivi attenuati (Jones, 1996; Catelli *et al.*, 2006; c'è bibliografia per reversione a virulenza del sottotipo B). Viste la variabilità del *Metapneumovirus* aviare, l'evoluzione genetica e la possibilità di un ritorno alla virulenza di ceppi vaccinali, molti gruppi di ricerca si stanno concentrando sullo sviluppo di vaccini di nuova generazione, come virosomi, vaccini a sub-unità o ricombinanti, che, con appropriati livelli di protezione e sicurezza, potrebbero rappresentare la frontiera futura (Cecchinato *et al.*, 2016).

1.4 BIBLIOGRAFIA

1. Bayatzadeh M.A., Pourbakhsh S. A., Ashtari A., Abtin A. R., Abdoshas M.. Molecular typing of Iranian field isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vaccine strain MS-H using *vlhA* gene. *British Poultry Science*. 55:145-156
2. Bayo-Auboyer M.-H., Arnauld C., Toquin D., Etterradossi 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.
3. Bencina D., Dobnic V. M., Horvat S., Narat M., Kleven S. H., Dovc P.. 2001. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* haemagglutinin. *FEMS Microbiology Letters*. 203: 115-123.
4. Bennet R.S., McComb B., Shin M.K., 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.
5. Bennet R.S., LaRue R., Shaw D., Yu Q., Nagaraja K.V., Halvorson D.A., Njenga M.K. 2005. A wild goose Metapneumovirus containing a large attachment glycoprotein is avirulent but immunoprotective in domestic turkeys. *Journal of virology*, 79:14834-14842.
6. Buys S.B., Du Preez J.H., Els H.J. 1989. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *Journal of the South Africa Veterinary Association*, 4:221-222.

7. Catania S., Bilato D., Gobbo F., Granato A., Terregino C., Iob L., Nicholas R. A.. 2010. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian diseases*, 54:961-4.
8. Catania S., Gobbo F., Ramirez A. S., Guadagnini D., Baldasso E., Moronato M. L., R. A. J. Nicholas. 2016a. Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Veterinary Research*.. 12:52. DOI 10.1186/s12917-016-0680-1.
9. Catania S., Gobbo F., Bilato D., Gagliazzo L., Moronato M.L., Terregino C., Bradbury J.M., Ramirez A.S. 2016b. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Vet Microbiology*, 193:60-6. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.08.007.
1. Catelli E., Cecchinato M., Savage C.E., Jones R., Naylor C.J. 2006. Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. *Vaccine*, 24:42-43.
2. Cavanagh D., Mawditt K., Britton P., Naylor C.J. 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian oncovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian pathology*, 28:563-605.
3. Cecchinato M., Lupini C., Ricchizzi E., Falchieri M., Meini A., Jones R.C., Catelli E. 2012. Italian field survey reveals a high diffusion of avian metapneumovirus subtype B in layers and weaknesses in the vaccination strategy applied. *Avian diseases*,56:720-724.
4. Cecchinato M., Drigo M., Lupini C., Martini M., Listorti V., Franzo G., Bonci M., Laconi A., Morandini E., Catelli E. 2013a. Diffusione dell'infezione da metapneumovirus aviare in allevamenti di tacchini e broiler del Nord Italia. *Large Animal Review*, 19:267-270.

5. Cecchinato M., Lupini C., Pogoreltseva O.S.M., Listorti V., Mondin A., Drigo M., Catelli E. 2013b. Development of a real-time RT-PCR assay for the simultaneous identification, quantitation and differentiation of avian metapneumovirus subtype A and B. *Avian pathology*, 42:283-289.
6. Cecchinato M., Catelli E., Lupini C., Ricchizzi E., Prosperi S., Naylo R.J. 2014. Reversion to virulence of a subtype B avian metapneumovirus vaccine: Is it time for regulators to require availability of vaccine progenitors? *Vaccine*, 36:4660-4664.
7. Cecchinato M., Ferreira H.L., Munir M., Catelli E. 2016. Avian Metapneumovirus. In: *Molecular epidemiology and control, Mononegavirus of veterinary importance vol.2*. Pag. 127-143. CAB International 2016.
8. Cha R.M., Yu Q., Zsak L. 2013. The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. *Virology Journal*, 10:1-8.
9. Collins M.S., Gough R.E., Alexander D.J. 1993. Antigenic differentiation of avian metapneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian pathology*, 22:469-479.
10. Cook J.K.A, Jones B.V., Ellis M.M., Li J., Cavanagh D. 1993. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian pathology*, 22:257-273.
11. Cook J.K.A., Huggins M.B., Orbell S.J., Senne D.A. 1999. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian pathology*, 28:607-617.

12. Cook J.K.A. 2000. Avian Pneumovirus infection of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal*, 160:118-125.
13. Cook J.K.A and Cavanagh D. 2002. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian pathology*, 31:117-132.
14. Delaney N. F., Balenger S., Bonneaud C., Marx C. J., Hill G. E., Ferguson-Noel N., Tsai P., Rodrigo A., Edwards S. V.. 2012. Ultrafast Evolution and Loss of CRISPRs Following a Host Shift in a Novel Wildlife Pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS Genet.* 8 (2) : e1002511.
15. El-Gazzar M.M., Wetzel A.N., Raviv Z. 2012. The genotyping potential of the *Mycoplasma synoviae* *vlhA* gene. *Avian Diseases*, 56:711-9.
16. Eterradossi N., Toquin D., Picault J.P., Jestin V. 2015. Avian metapneumovirus. In: Brugère-Picoux J., Vaillancourt J.P., Bouzouaia M., Venne D., Shivaprasad H.L. *Manual of poultry diseases*, 20:157-163.
17. Fabris G., D'Aprile P.N. 1990. Rinotracheite infettiva del tacchino: osservazioni sul campo ed indagini di laboratorio. *Zootecnica International*, 6: 36-40.
18. Feberwee A., Morrow C. J., Ghorashi S.A., Noormohammadi A. H., Landman W. J.. 2009. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathology*, 38 (5) : 333-40.
19. Ferguson-Noel N. and Noormohammadi A.H. 2013. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Swayne D.E. *Disease of poultry*. Pag. 900-910. 13th Ed. Wiley-blackwell.

20. Franzo G., Drigo M., Lupini C., Catelli E., Laconi A., Listorti V., Bonci M., Naylor C.J., Martini M., Cecchinato M. 2014. A sensitive, reproducible, and economic real-time reverse transcription PCR detecting avian metapneumovirus subtypes A and B. *Avian diseases*, 52:216-222.
21. Garaibeh S, Shamoun M. 2012. Avian Metapneumovirus subtype B experimental infection and tissue distribution in chicken, sparrows and pigeons. *Veterinary pathology*, 49:704-709.
22. Gobbo F., Moronato M.L., Flaminio B., Boscarato M., Santone C., Catania S. 2016. Possibile strategia di contenimento di *Mycoplasma synoviae* in un gruppo di riproduttori pesanti. *Atti del I° Simposio Scientifico SIPA* Pag.179-182., Parma, 23 settembre.
23. Jing L., Cook J.A., David T., Brown K., Shaw K., Cavanagh D. 2013. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkey using the polymerase chain reaction. *Avian pathology*, 22:771-783.
24. Jones R.C. 1996. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. *Avian Pathology*, 25:639-648.
25. Jones R.C. and Rautenschlein S., 2013. Avian Metapneumovirus. In: Swayne D.E. *Disease of poultry*. Pag. 112-125. 13th Ed. Wiley-blackwell.
26. Juhasz K.and Easton A.J. 1994. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *Journal of General Virology*, 75:2873-2880.
27. Kempf I., 2015. Avian Mycoplasmosis. In: Brugère-Picoux J., Vaillancourt J.P., BouzouaiaM., VenneD., Shivaprasad H.L. *Manual of poultry diseases*, 41, 279-285.

28. Kreizinger Z, Sulyok KM, Pásztor A, Erdélyi K, Felde O, Povazsán J, et al. (2015) Rapid, Simple and Cost-Effective Molecular Method to Differentiate the Temperature Sensitive (ts+) MS-H Vaccine Strain and Wild-Type *Mycoplasma synoviae* Isolates. PLoS ONE 10(7): e0133554. doi:10.1371/journal.pone.0133554
29. Kleven S. H.. 2008. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. Avian dis. 52: 367-374
Landman WJ. 2014. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. Avian Pathol. 43 (1) : 2-8.
30. 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 pheasants in a live bird market. Virus Research, 128:18-27.
31. Listorti V., Lupini C., Cecchinato M., Pesente P., Rossi G., Giovanardi D., Naylor C.J., Catelli E. 2014. Rapid detection of subtype B avian metapneumoviruses using RT-PCR restriction endonuclease digestion indicates field circulation of vaccine-derived viruses in older turkeys. Avian pathology, 43:51-56.
32. Lupini C., Cecchinato M., Ricchizzi E., Naylor C.J., Catelli E. 2011. Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. Avian pathology, 40:525-530.
33. Marien M. 2007. Mixed respiratory infections in turkeys, with emphasis on avian Metapneumovirus, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Escherichia coli* and *Mycoplasma gallisepticum*. Thesis for the degree of Doctor in Veterinary Science (Ph.D.), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.

34. Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. 2013. The Mycoplasmas (class: mollicutes). In: Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D., Clinical veterinary microbiology, Pag. 423-431. Mosby Elsevier, 2nd Edition.
35. Markham J. F., Morrow C. J., Scott P. C., Whithear K. G.. 1998a. Safety of a temperature-sensitive clone of *Mycoplasma synoviae* as a live vaccine. Avian diseases, 42: 677-681.
36. Markham J. F., Scott P. C., Whithear K. G.. 1998b. Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. Avian diseases, 42 : 682-689.
37. Morrow C. J., Markham J. F., Whithear K. G.. 1998. Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. Avian Diseases, 42: 667-70.
38. Naylor C.J., Worthington K.J., Jones R.C. 1997. Failure of maternal antibodies to protect young turkey poults against challenge with turkey rhinotracheitis virus. Avian diseases, 41:968-971.
39. Noormohammadi A.H., Jones J. F., Harrigan K.E., Whithear K.G. 2003. Evaluation of a non-temperature sensitive field clonal isolates of the *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H. Avian Diseases, 47:355-360.
40. Noormohammadi A.H. 2007a. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. Avian Pathology, 36:439-44.
41. Noormohammadi A.H., Hemmatzadeh F., Whithear K. 2007b. Safety and Efficacy of the *Mycoplasma synoviae* MS-H Vaccine in Turkeys. Avian Dis 51:550-554.
42. OIE Terrestrial Manual. 2008. Avian Mycoplasmosis, Chapter 2.3.5

43. Ogino S., Munakata Y., Ohashi S., Masato F., Sakamoto H., Sekiya Y., Noormohammadi A.H., Morrow C.. 2011. Genotyping of japanese field isolates of *Mycoplasma synoviae* and rapid molecular differentiation from the MS-H vaccine strain. *Avian Diseases*, 55:187-194.
44. Pattison M., Chettle N., Rabdall C.J., Wyeth P.J. 1989. Observation of swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Veterinary record*, 125:229-231.
45. Seal B.S. 2000. Avian pneumoviruses and emergence of a new type in the United States of America. *Animal Health Research Reviews*, 1:67-72.
46. Shahid M., P. F. Markham, J. F. Markham, M. S. Marena, and A. H. Noormohammadi. 2013. Mutations in GTP binding protein obg of *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H: implications in temperature sensitivity phenotype. *PLOSOne* . 8 (9): e73954.
47. Shahid M. A., P. F. Markham, M. S. Marena, R. Agnew-Crumpton, and A. H. Noormohammadi. 2014. High-resolution melting-curve analysis of obg gene to differentiate the temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H from non-temperature-sensitive strains. *PLoS ONE*. 9 (3): e92215. DOI: 10.1371/journal.pone.0092215.
48. Tucciarone C.M., Franzo G., Lupini C., Alejo C.T., Listorti V., Mescolini G., Brandão P.E., Martini M., Catelli E., Cecchinato M. 2017. Avian metapneumovirus in broilers in Italy. *Poultry Science*, In corso di pubblicazione.

PARTE A

Interazione tra *Metapneumovirus aviare* (aMPV) e *Mycoplasma synoviae* (MS) in *broiler* inoculati sperimentalmente: studio della diffusione dei patogeni tramite *real-time* PCR.

2.1 INTRODUZIONE

Tra i diversi agenti ad eziologia virale responsabili di patologia respiratoria in campo avicolo, i *Metapneumovirus* aviari (aMPVs), appartenenti alla famiglia dei *Pneumoviridae*, causano gravi conseguenze sanitarie e importanti danni economici legati principalmente alla colonizzazione delle vie aeree superiori e a forme cliniche, caratterizzate da elevata morbilità e bassa mortalità (Jones e Rautenschlein, 2013). Osservazioni effettuate in Francia in allevamenti di tacchini hanno dimostrato come l'infezione da aMPV possa essere correlata a conseguenze negative sulla produttività degli animali, testimoniate dal minore incremento ponderale e dagli elevati scarti in sede di macellazione (Perreul *et al.*, 2017). Nel tacchino l'aMPV è stato ampiamente documentato ed identificato come agente patogeno, mentre nel pollo il ruolo del virus come agente patogeno primario è definito meno chiaramente (Cook, 2000); tuttavia informazioni provenienti dal campo testimoniano un aumento delle forme cliniche respiratorie correlabili ad aMPV in allevamenti di *broiler* distribuiti sul territorio nazionale (Tucciarone *et al.*, 2017).

L'infezione da aMPV presenta una natura di per sé autolimitante, che, tuttavia, può aggravarsi, comportando importanti perdite economiche, nel caso di concomitanti infezioni batteriche. Osservazioni di campo suggeriscono che aMPV possa potenziare nel tacchino l'infezione da *Ornithobacterium rhinotracheale* (Van Empel e Hafez, 1999; Jones e Rautenschlein, 2013) e, in condizioni sperimentali, l'infezione da MG (Naylor *et al.*, 1999) e da *E. coli* (Jones e Rautenschlein, 2013). Diversi agenti, quali *Bordetella avium*, organismi *Pasteurella-like*, *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae*, hanno dimostrato la capacità di esacerbare e prolungare la

patologia clinica causata dal *Metapneumovirus* (Jirjis *et al.*, 2004; Cook *et al.*, 1991; Marien, 2007; Jones e Rautenschlein, 2013). La maggior parte degli studi di patogenesi riguardanti i *Metapneumovirus* aviari, in particolare il sottotipo A e B (Aung *et al.*, 2008), e delle prove sperimentali riguardanti la co-infezione tra aMPV e batteri sono stati effettuati nella specie tacchino.

In letteratura soltanto quattro pubblicazioni hanno preso in considerazione la possibile relazione tra *Metapneumovirus* aviare e *Mycoplasma spp.* (Naylor *et al.*, 1999; Marien, 2007; Ganapathy *et al.*, 1998; Khehra *et al.*, 1999). A questo proposito, Naylor *et al.* (1999), riproducendo nel tacchino la co-infezione da aMPV ed MG, hanno potuto verificare la presenza di sintomatologia clinica, lesioni macroscopiche e microscopiche più gravi in presenza di entrambi gli agenti patogeni. In questi soggetti, inoltre, è stato possibile l'isolamento colturale di MG per un tempo maggiore, rispetto a quanto avvenuto nel gruppo infettato dal solo micoplasma. Le possibili interazioni patologiche date da MG e aMPV, in concomitanza a *E.coli* e *Ornithobacterium rhinotracheale*, sono state descritte da Marien *et al.* (2007). Ganapathy *et al.* (1998) hanno riprodotto sperimentalmente l'infezione data da *Mycoplasma imitans* (MIIm) e aMPV in tacchini di un giorno di vita, evidenziando un'interazione di tipo sinergico tra i due agenti, testimoniata nel gruppo co-infetto da una diffusione di MIIm ad organi più profondi come sacchi aerei e polmoni, da un maggior numero di lesioni macroscopiche che risultano inoltre più gravi, da una prolungata sintomatologia clinica e infine da una risposta immunitaria più marcata. Infine, Khehra *et al.* (1999) hanno riprodotto in tacchinotti di un giorno di vita l'infezione da aMPV e *Mycoplasma synoviae*, verificando la possibilità di un effetto sinergico tra i due agenti.

La maggior parte degli studi sperimentali ha quindi previsto l'inoculo ad un giorno di vita di animali appartenenti alla specie tacchino e la somministrazione contemporanea di entrambi gli agenti infettivi, discostandosi da quanto solitamente avviene in corso di infezione naturale, in cui l'infezione virale precede la successiva colonizzazione batterica e sono colpiti soggetti di età

superiore. Inoltre, poche sono le conoscenze ad oggi disponibili sul ruolo di aMPV nella specie pollo e sulla possibile interazione con i micoplasmi.

2.2 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del presente lavoro è quello di riprodurre sperimentalmente la co-infezione tra *Metapneumovirus* aviare e *Mycoplasma synoviae* nella specie pollo, categoria *broiler*, cercando di replicare le possibili condizioni di campo sulla base del momento dell'infezione, della via di inoculo degli agenti e dei ceppi di campo selezionati.

Obiettivo principale di questo studio è valutare la diffusione dei due patogeni nei diversi gruppi sperimentali, tramite applicazione di real-time PCR specifiche, oltre ad approfondire le conoscenze circa le possibili interazioni tra di essi nell'ospite, con l'ausilio inoltre dei dati relativi alla sintomatologia clinica evidenziata durante la prova e alle lesioni macroscopiche rilevate in sede autoptica.

2.3 MATERIALI E METODI

Per la prova sperimentale sono stati utilizzati 180 animali appartenenti alla specie *Gallus gallus*, di genetica Cobb 708. Gli animali sono stati accasati all'età di 1 giorno di vita presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (sede di Legnaro, Padova) e stabulati, per l'intera durata della prova, all'interno di isolatori di tipo Montair® nel rispetto in tutti i suoi punti della normativa relativa al benessere animale (2010/63/UE) e previa autorizzazione da parte dell'Organo Preposto al Benessere Animale (IZSVe) e ministeriale (Autorizzazione Min. Sal. N°799/2015-PR rilasciata in data 30/07/2015). Gli animali provenivano da un allevamento routinariamente monitorato per i patogeni di interesse e riconosciuto MG, MS e aMPV *free*.

La prova, che ha avuto una durata complessiva di 35 giorni, ha previsto per i primi 15 giorni di vita, l'utilizzo di lampade riscaldanti a infrarossi poste all'interno di ciascun isolatore per garantire la temperatura nell'intervallo di benessere, in considerazione dell'età dei volatili, secondo le indicazioni della raccomandazione 2007/526/CE. L'acqua e il mangime sono stati forniti *ad libitum* per l'intera durata della prova, in particolare il mangime somministrato è stato di tipo commerciale, con un alimento di "primo periodo" fino all'età di 28 giorni in seguito sostituito da un mangime di "secondo periodo" (Figura 1 e 2).

Al momento dell'accasamento (1 giorno di vita) gli animali sono stati divisi in modo *random* a formare 4 gruppi sperimentali da 35 animali ciascuno, mentre un totale di 20 animali è stato sacrificato in modo umanitario per l'esecuzione di test sierologici (ELISA MG, ELISA MS, ELISA

aMPV - Idexx® USA e SAR MG, SAR MS - IDVET, Montpellier) e biomolecolari (PCR MG ed PCR MS da tampone tracheale, PCR aMPV da fessura palatina) diretti alla valutazione dello stato sanitario del gruppo verso i patogeni oggetto di studio.

Gli animali sono stati accasati ad 1 giorno di vita al fine di garantire un loro migliore acclimatemento e conseguentemente un minore stress al momento dell'infezione. Il giorno prima dell'inoculo del primo agente infettivo (aMPV) 5 animali per gruppo sono stati sottoposti a prelievo ematico per la ripetizione dei test ELISA MS, MG e aMPV e per la ricerca del virus e di MS ed MG in PCR.



Figura 1 e 2. Allestimento degli spazi adibiti alla stabulazione degli animali per la prova sperimentale e accasamento degli stessi ad un giorno di vita in isolatori di tipo Montair®.

Tutti gli animali sono stati identificati singolarmente con l'utilizzo di fascette colorate e numerate. All'interno di ciascun gruppo sperimentale sono stati selezionati, in modo casuale al momento dell'accasamento, 5 animali, considerati "soggetti donatori" per l'esecuzione degli esami sierologici per l'intera durata della prova.

I 4 gruppi sperimentali sono stati così strutturati:

- Gruppo A-gruppo aMPV: animali inoculati con aMPV per via oculo-nasale all'età di 15 giorni, a 18 giorni hanno ricevuto terreno di coltura sterile per *Mycoplasma spp.*
- Gruppo B-gruppo coinfecto (aMPV + MS): animali inoculati con aMPV per via oculo-nasale all'età di 15 giorni e a 18 giorni con *Mycoplasma synoviae*.
- Gruppo C-gruppo MS: a 15 giorni hanno ricevuto terreno MEM (*Minimum Essential Medium*) sterile e all'età di 18 giorni sono stati inoculati con *Mycoplasma synoviae* per via oculo-nasale.
- Gruppo E-controllo negativo: questi animali hanno ricevuto MEM sterile a 15 giorni e terreno di coltura sterile per *Mycoplasma spp.* a 18 giorni.

I ceppi utilizzati per l'infezione sperimentale sono:

- *Avian Metapneumovirus*: IT/CK/34a/02, isolato da pollo, appartenente al sottotipo B, inoculato per via oculo-nasale bilateralmente con una quantità di 25 µL per ciascun occhio e narice, con titolo $10^{5,47}$ TCID₅₀/mL (dose inoculata a ciascun soggetto pari a $10^{4,47}$ TCID₅₀).
- *Mycoplasma synoviae*: isolato da pollo da carne, classificato sulla base del gene *vlhA* come *type F*, inoculato per via oculo-nasale bilateralmente ad una quantità di 25 µL per ciascun occhio e narice, con un titolo di $1,38 \times 10^8$ CCU/mL (dose inoculata a ciascun soggetto pari a $1,38 \times 10^7$ CCU).

Le manualità effettuate durante l'infezione degli animali sono descritte in Figura 3 e 4.



Figura 3 e 4. Infezione sperimentale per via oculo-nasale.

Esame clinico degli animali

Gli animali sono stati monitorati quotidianamente per valutare il rispetto delle condizioni di benessere animale e lo stato sanitario tramite un esame clinico completo. Le osservazioni cliniche effettuate hanno previsto un esame obiettivo generale ed un esame obiettivo particolare dell'apparato respiratorio, con particolare attenzione nei confronti dei seguenti segni/sintomi: fame d'aria, respirazione difficoltosa, edema peri-palpebrale, scolo nasale (chiaro/torbido), congiuntivite e blefarite; infine nell'arco della prova sperimentale è stata valutata la possibile presenza di segni di depressione/letargia nei gruppi sperimentali.

Esami sierologici

A 22-25-29 e 35 giorni di vita, 5 soggetti per gruppo, selezionati *random*, sono stati sottoposti, prima della soppressione, a prelievo ematico dalla vena ulnare, per l'esecuzione di indagini sierologiche verso i patogeni oggetto di studio. A ciascuna di queste scadenze è stato eseguito anche il prelievo ematico degli animali selezionati come "donatori" all'inizio della prova sperimentale.

I sieri sono stati testati per la presenza di anticorpi verso aMPV utilizzando un kit commerciale ELISA Flockcheck[®] APV Ab (IDEXX laboratories) secondo le indicazioni suggerite dalla casa produttrice. La ricerca di anticorpi nei confronti di MS è stata effettuata sia in SAR (procedura interna IZSve), che in ELISA (Mycoplasma synoviae antibody test kit - IDEXX laboratories), sfruttando anche in questo caso kit commerciali ed eseguendo i test secondo le modalità d'uso descritte dall'azienda. I campioni sono stati considerati positivi in ELISA MS per titoli superiori a 1046 OD ed in ELISA aMPV per valori superiori a 396 OD.

Esame anatomo-patologico

Secondo cadenze regolari (18-20-22-25-29-35 giorni di vita), a partire dal giorno 18 di vita, 5 animali per gruppo, selezionati a *random* sono stati sacrificati secondo le procedure correnti e nel rispetto del benessere animale. Le scadenze previste durante la sperimentazione e le relative attività sono schematicamente riportate in Figura 5.

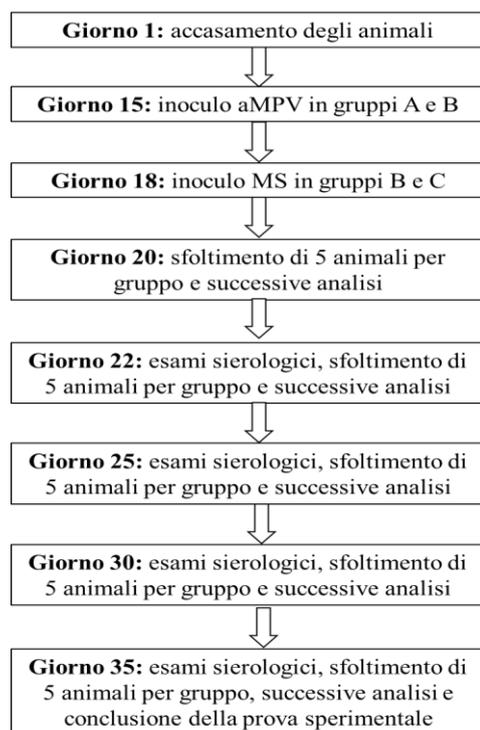


Figura 5. Rappresentazione schematica delle attività svolte durante la prova sperimentale.

A ciascuna delle sopradescritte cadenze (18-20-22-25-30-35 giorni di vita) le carcasse sono state quindi sottoposte ad esame autoptico completo nel corso del quale le lesioni evidenziate a carico dell'apparato respiratorio o riferibili ad un problema di natura respiratoria sono state classificate secondo uno schema di *grading* sviluppato *ad hoc*.

Si riporta di seguito lo schema di classificazione utilizzato per la valutazione degli organi dell'apparato respiratorio (Tabella 1):

PUNTEGGIO ORGANO	0	1	2	3
Congiuntiva	Assenza di lesioni	Congestione	Congiuntivite sierosa/schiumosa	Congiuntivite con presenza di essudato fibrinoso
Turbinati nasali	Assenza di lesioni	Congestione	Essudazione sierosa	Essudazione catarrale
Seni infra-orbitali	Assenza di lesioni	Sinusite sierosa	Sinusite sierofibrinosa	Sinusite fibrinosa
Testa gonfia	Assenza di lesioni	Edema peri-palpebrale localizzato	Edema peri-palpebrale diffuso	Edema diffuso con emorragie e cellulite

Testa (tessuti molli, cresta e bargigli)	Assenza di lesioni	Congestione della cresta	Cianosi della cresta	Testa gonfia
Congiuntiva	Assenza di lesioni	Iperemia/ congestione	Ipertrofia associata a congestione	
Laringe	Assenza di lesioni	Iperemia/ congestione	Congestione – essudazione siero-catarrale	Emorragica
Trachea	Assenza di lesioni	Iperemia – lieve essudazione sierosa	Essudazione siero-catarrale	Emorragica
Sacchi aerei	Assenza di lesioni	Opacamento – neovascolarizzazione	Aerosacculite sierosa	Aerosacculite siero-fibrinosa
Polmoni	Assenza di lesioni	Iperemia/congestione	Polmonite a focolai	Polmonite diffusa

Tabella 1. Schema di classificazione delle lesioni applicato in sede autoptica.

Esame microbiologico

In sede autoptica, si è proceduto ad effettuare da 3 animali, selezionati in modo casuale ed anche in assenza di lesioni macroscopicamente evidenti, l'esame microbiologico da polmone sinistro, milza, pericardio, cervello, con l'obiettivo di escludere la presenza di altri agenti microbici responsabili di patologia respiratoria. Al contrario, l'articolazione tibio-tarsica è stata inclusa solo in caso di alterazioni manifeste. I terreni utilizzati sono stati agar sangue, Mc Conkey, HIB, AS+GP, BEA. E' stato inoltre considerata la possibilità di eseguire ulteriori indagini microbiologiche in associazione ad evidenti quadri patologici complicati.

Esami di tipo biomolecolare

In sede necroscopica sono stati eseguiti i tamponi dai seguenti organi per l'esecuzione delle indagini di tipo biomolecolare tramite *real-time* RT-PCR aMPV e *real-time* PCR MS dai seguenti organi:

-apparato respiratorio: turbinati nasali e fessura palatina, congiuntiva, trachea, sacco aereo destro, polmone;

-organi sistemici, rene, milza, tonsille cecali, cloaca, cervello, articolazione tibio-tarsica (solo per PCR MS).

Il campionamento è avvenuto in modo standardizzato tramite l'applicazione del tampone e il suo sfregamento per un tempo fisso di 5''. Ciascun tampone è stato stemperato in 1 mL di PBS sterile per un tempo standardizzato tra i diversi gruppi sperimentali ed in seguito suddiviso in due aliquote destinate alle due procedure.

- Per le attività inerenti *Mycoplasma synoviae* si è proceduto all'estrazione di 300 µL di ciascuna aliquota di stemperato con il sistema automatizzato Maxwell[®] 16 LEV (Promega[®]) secondo le indicazioni fornite dalla ditta: ciascuno dei 540 campioni è stato addizionato di 300 µL di *Lysis Buffer* e 30 µL di proteinasi K ed in seguito sottoposto a trattamento termico alla temperatura di 56°C per 20'. In seguito, si è proceduto all'esecuzione della real-time PCR MS secondo quanto descritto da Raviv *et al.* (2009) leggermente modificato. Brevemente, tale procedura presenta come *target* il gene 16s-23s che è stato amplificato utilizzando i *primer* e la sonda riportati rispettivamente in Tabella 2. e 3.

Gene	Primer	Sequenza	Prodotto
16S-	MS 16S-23S -f	5'-CTAAATACAATAGCCCAAGGCAA-3'	119 (bp)
23S	MS 16S-23S -r	5'-CCCTCCTTTCTTACGGAGTACA-3'	

Tabella 2. Primer per l'esecuzione della PCR real-time per MS (f= *forward*, r=*reverse*).

Sonda	F 5' (R)	λ nm	Sequenza	F 3' (Q)	λ nM
MS 16S- 23S	6-FAM	530 (A)	CGCGATCATTGTGACAGCCA GCTTCACGATCGCG	3BHQ_1	480-580 (A)

Tabella 3. Sonda per l'esecuzione della PCR real-time per MS (f=fluorocromo, r=reporter, q=quencher, A=Assorbimento, E=Emissione, 6-FAM=6-carbossi-fluorescina, 3BHQ= Black Hole Quencher).

La *reaction mix* presenta un volume finale di 20 μ L costituiti da 10 μ L di acqua per biologia molecolare, 4 μ L di LightCycler TaqMan Master 5x, 1 μ L di ogni *primer* [(10 μ M) MS 16S-23S *forward* ed MS 16S-23S *reverse*], 2 μ L della sonda [2 μ M] e 2 μ L di DNA. La reazione di PCR è avvenuta nello strumento LightCycler 2.0 utilizzando il seguente profilo termico: denaturazione iniziale 95°C per 10', seguita da denaturazione a 95°C per 10'', *annealing* a 60°C per 30'' ed estensione a 72°C per 1', ripetuto per 45 cicli, infine seguito da estensione a 72°C per 1' e raffreddamento a 40°C per 30''.

L'acquisizione della fluorescenza avveniva nella fase di *annealing* a 530nm (FAM), in seguito i dati sono stati raccolti ed analizzati tramite il *software* fornito con lo strumento. Al fine della corretta esecuzione delle prove, in ciascuna sessione di amplificazione è stato incluso un controllo negativo, in cui il DNA è stato sostituito con acqua sterile ultra pura, e un controllo positivo di processo rappresentato dal DNA del ceppo di riferimento MS NCTC 10124.

- L'estrazione dell'RNA virale da 600 campioni è stata eseguita utilizzando il kit commerciale High Pure Viral RNA® kit (ROCHE™) seguendo le istruzioni della casa produttrice. Per evidenziare aMPV da RNA estratto è stata impiegata una RT-qPCR che ha utilizzato una coppia di *primer* disegnata sulle sequenze del gene che codifica per la proteina *Small*

Hydrophobic (SH) (Tabella 4) e la sonda Molecular Beacon, specifica per AMPV sottotipo B (Tabella 5), secondo quanto descritto da Cecchinato *et al.* (2013).

Gene	Primer	Sequenza	Posizione	Prodotto
SH	SH-f	5'-TAGTTTTGATCTTCCTTG TTC-3'	5499-5520	109 (bp)
	SH-r	5'-GTAGTTGTGCTCAGCTCTGATA-3'	5607-5586	

Tabella 4. Primer per l'esecuzione della RT-qPCR per aMPV B (f= *forward*, r=*reverse*)

Sonda	F 5' (R)	λ nm	Sequenza	F 3' (Q)	λ nM
MB	6-FAM	494	CGCGATCATTGTGACAGCCA	3IABkFQ	420-620
SH-B		(A)	GCTTCACGATCGCG	(iowa	max a
		518		Black [®] FQ	531
		(E)			

Tabella 5. Sonda per real- time PCR per aMPV sottotipo B (f=fluorocromo, r=reporter, q=quencher, A=Assorbimento, E=Emissione, 6-FAM=6-carbossi-fluorescina).

La *reaction mix* impiegata ha un volume finale di 10 μ L ed è composta da: 0,25 μ L di SuperscriptIII RT/Platinum Taq mix, 5 μ L di 2x *Reaction mix*, 0,5 μ L di ogni *primer* [(20 μ M) SH *forward* ed SH *reverse*], 0,38 μ L della sonda [(20 μ M) MB SH B], 2,37 μ L di acqua per biologia molecolare e 1 μ L di RNA virale. Per la preparazione della *reaction mix* si è usato il kit SuperScript. III Platinum[®] One- Step Quantitative RT-PCR System (Cat. No.: 11732-020, Life technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), che prevede, in successione la retrotrascrizione e l'amplificazione del cDNA (*complementary DNA*) nella medesima provetta. E' stato utilizzato il termociclatore LightCycler[®] Nano Instrument (RocheTM), impostato con il seguente programma: una prima fase di retrotrascrizione a 45°C per 30 minuti, dopodiché il campione veniva sottoposto ad una temperatura di 95°C per 2 minuti, ed in seguito a 45 cicli di: denaturazione a 95°C per 15 secondi, *annealing* a

45°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 0,5 secondi. Al termine la piastra veniva raffreddata a 40°C per 30 secondi ad una velocità di 1,5°C/s. L'acquisizione della fluorescenza avveniva a 45°C, cioè, nella fase di *annealing*. I valori di fluorescenza sono stati raccolti e analizzati tramite il *software* fornito dallo strumento.

Per il calcolo delle curve di amplificazione, è stata creata appositamente una curva standard, che servisse al *software* come criterio di riferimento per la quantificazione virale. La curva, specifica per il ceppo utilizzato per l'infezione sperimentale (IT/CK/34a/02), è stata ottenuta eseguendo prove di RT-qPCR a partire da soluzioni del virus a concentrazione nota ($5.1 \log_{10} \text{ID}_{50}/\text{ml}$). In breve, sono state eseguite delle diluizioni seriali in scala 1:10 dell'RNA virale, eseguite in quadruplicato, partendo da una soluzione virale non diluita fino ad arrivare ad una diluizione finale di 10^{-7} . Al fine della corretta esecuzione delle prove, ogni esperimento di RT-qPCR è stato eseguito pianificando accuratamente uno schema preciso di reazione che comprendeva l'inserimento di un controllo negativo (acqua per biologia molecolare), dei campioni da testare e un controllo positivo titolato che serviva anche per ricalibrare la curva di titolazione standard ad ogni nuova reazione.

Isolamento di *Mycoplasma synoviae*

Infine, al termine della prova sperimentale (35 giorni di vita) gli animali dei gruppi A e B sono stati sottoposti a campionamento tramite tampone tracheale per l'esecuzione dell'isolamento colturale per *Mycoplasma spp.*. I campioni sono stati seminati in terreno liquido *Mycoplasma Experience*[®] secondo la procedura interna dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie e incubati a 37°C con il 5% di CO₂ per almeno 15 giorni. Nell'arco di questo periodo di tempo, le colture sono state controllate quotidianamente per valutare la presenza di segni di crescita, quali variazioni del colore della brodocoltura o aumento della torbidità. Quando questi segni sono stati evidenziati, si è proceduto ad effettuare un inoculo del brodo su un piastrino di agar per valutare la presenza di colonie tipiche "a uovo fritto". I terreni solidi sono stati quindi mantenuti incubati per 15 giorni e

considerati negativi nel caso in cui nessun segno di crescita sia stato evidenziato. Nel caso di campioni positivi, è stato estratto il DNA di un'aliquota di brodocoltura di circa 300 µL con l'utilizzo di un estrattore automatico Maxwell16 Promega® seguendo le istruzioni indicate dalla casa produttrice. L'identificazione dei campioni positivi all'esame colturale è stata effettuata tramite la 16s-rDNA-PCR-DGGE, utilizzando un gradiente di 30-60%, secondo quanto descritto da McAuliffe *et al.*, (2005). Infine, i campioni identificati come *Mycoplasma synoviae* sono stati sottoposti ad ulteriore reazione di PCR diretta all'amplificazione del gene *vlhA* (Tabella 6), alla successiva reazione di purificazione ed infine al sequenziamento del *target* in entrambe le direzioni. Le sequenze geniche ottenute sono state analizzate utilizzando il software MEGA6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) e paragonate con le sequenze di riferimento pubblicate (Bencina *et al.*, 2001), in modo da confermare l'identità del ceppo di MS isolato con quello di partenza.

Gene target	Primer forward	Primer reverse	Prodotto (bp)
vlhA	vlhA-F	5'-ATT AGC AGC TAG TGC AGT GGC C-3'	315-372
	vlhA-R2	5'-AGT AAC CGA TCC GCT TAA TGC-3'	

Tabella 6. *Primer* per l'esecuzione della genotipizzazione dei ceppi di MS.

2.4 RISULTATI

Nel corso della prova sperimentale non è stata evidenziata mortalità nei 4 gruppi di animali.

Tutti gli esami sierologici e biomolecolari effettuati sugli animali prima delle infezioni sperimentali (a 1 e 14 giorni di vita) hanno dato esito negativo. Al termine della prova il gruppo A (gruppo aMPV) è stato testato sierologicamente e in PCR per *Mycoplasma synoviae*, il gruppo C (gruppo MS) per *Metapneumovirus aviare* e il gruppo E (controllo negativo) per entrambi gli agenti; per ciascun gruppo sono stati, inoltre, analizzati i sieri di 5 animali ed è stata eseguita 1 PCR da tampone di fessura palatina (aMPV) o da tampone tracheale (MS) di cinque soggetti in *pool*. Non sono state evidenziate positività e quindi è stata esclusa la possibilità di cross-contaminazione con i due patogeni all'interno degli isolatori durante il periodo di sperimentazione.

Sierologia

I risultati degli esami sierologici per aMPV (ELISA) o MS (SAR, ELISA) sono riportati in Tabella 1. E' stata evidenziata sieroconversione nei confronti di aMPV a partire dal 25° giorno di vita degli animali (10° giorno *post*-infezione con *Metapneumovirus aviare*) sia nel gruppo A (4 animali su 10), sia nel gruppo B (3 animali su 10). Al successivo momento di campionamento (29 giorni di vita) 3 animali del gruppo A sono risultati positivi in ELISA aMPV e 6 del gruppo B, mentre all'*end-point* 3 soggetti su un totale di 5 animali sono risultati positivi in entrambi i gruppi.

Tutti gli animali “donatori” e “non donatori” dei gruppi B e C hanno sierconvertito per MS in SAR a 29 giorni di vita (11 giorni *post*-infezione per MS); alla medesima età un animale del gruppo B è

risultato positivo in ELISA MS e tale dato è stato confermato anche all'ultimo momento di prelievo. Infine, un solo animale del gruppo C è risultato positivo in ELISA per MS solamente all'ultima data di campionamento (35 giorni di vita) (Tabella 7).

	Giorni di vita	ELISA aMPV	SAR MS	ELISA MS
A	22	0/10	n.e.	n.e.
	25	4/10	n.e.	n.e.
	29	3/10	n.e.	n.e.
	35	3/5	n.e.	n.e.
B	22	0/10	0/10	n.e.
	25	3/10	0/10	n.e.
	29	6/10	10/10	1/10
	35	3/5	10/5	1/5
C	22	n.e.	0/10	n.e.
	25	n.e.	0/10	n.e.
	29	n.e.	10/10	n.e.
	35	n.e.	10/5	1/5

Tabella 7. Risultati degli esami sierologici espressi come numero di animali positivi sul totale (n.e. = non effettuato).

Sintomatologia clinica

I risultati inerenti l'esame clinico giornaliero svolto nell'arco della prova sono riportati in modo dettagliato in Appendice 1.

L'infezione sperimentale ha portato al manifestarsi di sintomatologia clinica di tipo respiratorio nei gruppi A (aMPV), B (aMPV+MS) e C (MS). I sintomi evidenziati sono stati fame d'aria, edema peri-palpebrale, testa gonfia, segni di congiuntivite, scolo nasale e blefarite.

La sintomatologia clinica è comparsa in prima istanza negli animali del gruppo A (aMPV) come edema peri-palpebrale in 3 animali su 30, 2 giorni *post*-infezione (p.i.). Nei gruppi A, B e C sono stati riconosciuti segni clinici di tipo respiratorio a partire da 19 giorni di vita (4 giorni *post*-

infezione aMPV e 1 giorno *post*-infezione MS), quali edema peri-palpebrale e congiuntivite, in particolare nei gruppi A e B (8 animali su 25). L'edema peri-palpebrale è stato confermato in modo pressoché costante da 11 giorni p.i. con aMPV (26 giorni di vita) fino al termine della prova in tutti i gruppi, mentre la congiuntivite non è stata più segnalata dal 29° giorno di vita.

Il sintomo clinico principalmente rilevato nei diversi gruppi sperimentali è risultato la fame d'aria, comparso in prima istanza nel gruppo C a 21 giorni di vita (5% dei soggetti) ed in seguito negli animali degli altri due gruppi colpendo, nel corso dell'infezione sperimentale, fino all'80% degli animali del gruppo co-infetto (29 giorni di vita). Fame d'aria è stata osservata in tutti e tre i gruppi fino alla fine della prova. Edema esteso dalla regione peri-orbitale (denominato "testa gonfia") è stato evidenziato a partire da 22 giorni di vita (1 settimana p.i. con l'agente virale) fino al termine della sperimentazione e principalmente nei gruppi A e B. Soltanto in alcuni animali del gruppo B è stato rilevato scolo nasale "limpido" (6, 11, 12, 14 e 15 giorni p.i. aMPV) (Figura 6). Solo animali dei gruppi B e C hanno mostrato segni di blefarite (a 21 e 25 giorni di vita). Infine, tra i 23 e i 28 giorni di vita sono stati segnalati segni di depressione e letargia riscontrati più frequentemente negli animali del gruppo C.



Figura 6. Gruppo coinfecto (aMPV+MS): scolo nasale in seguito a compressione dei seni 6 giorni *post*-infezione con aMPV e 3 giorni con MS.

Lesioni macroscopiche

In tutti e tre i gruppi infettati sperimentalmente (A, B, C) sono state evidenziate lesioni macroscopicamente evidenti a carico dell'apparato respiratorio; i risultati sono riportati in dettaglio nell'Appendice 2. Gli organi complessivamente più colpiti sono stati trachea e sacchi aerei (Figura 7).

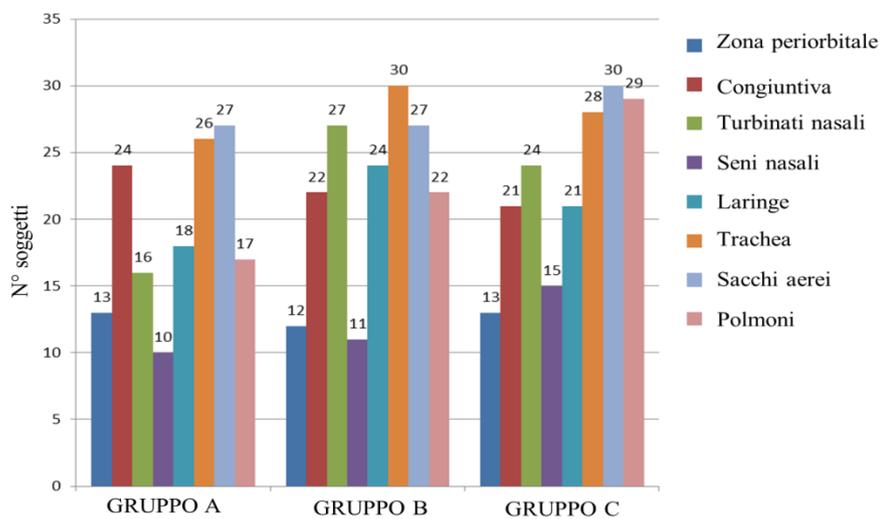


Figura 7. Numero di soggetti che presentavano lesioni macroscopiche in diversi organo nei gruppi sperimentali A (infettato con aMPV), B (aMPV+MS) e C (infettato con MS).

Nel gruppo A, le lesioni a carico di trachea e sacchi aerei sono risultate le più frequenti presentandosi in 26/30 animali e in 27/30 animali complessivamente. In questi organi, le alterazioni macroscopiche sono state evidenziate a partire da 3 giorni p.i. con aMPV e sono state classificate nella maggior parte dei casi come grado 1, ad eccezione di 2 soggetti con grado 2 nella trachea (3 giorni p.i.) e di 3 animali con grado 2 nei sacchi aerei (al termine della prova). Per quanto concerne la trachea, tutti gli animali hanno mostrato alterazioni macroscopiche ad ogni momento di prelievo, tranne all'*end-point* in cui sono state evidenziate solo in un soggetto su 5. A livello dei sacchi aerei la maggior parte dei soggetti ha presentato lesioni ad ogni campionamento. Solo a carico dei turbinati nasali (1 soggetto, 7 giorni *post*-infezione con aMPV) e del laringe (1 soggetto, 5 giorni p.i. con aMPV) sono state evidenziate lesioni classificabili come grado 3.

Nel gruppo B (aMPV+MS) la trachea e i turbinati sono risultati gli organi più colpiti nell'arco della sperimentazione. In ciascuna cadenza tutti gli animali hanno mostrato almeno lesioni di grado 1 a carico della trachea, a partire dal 5° giorno p.i. con aMPV sono state riconosciute anche lesioni di grado 2, riconosciute in 2 animali in questa data, in 1 a 29 giorni di vita e in 2 alla fine della prova. Anche nel caso dei turbinati nasali, la maggior parte degli animali ad ogni cadenza ha manifestato lesioni almeno di grado 1, a partire dal 5° giorno *post*-infezione con aMPV sono state rilevate anche lesioni di grado 2 ed in un soggetto di grado 3 (2 settimane *post*-infezione). Un soggetto 5 giorni *post*-infezione ed uno all'*end-point* hanno presentato lesioni di grado 3 a carico dei sacchi aerei.

Nel gruppo C (MS) i sacchi aerei e i polmoni hanno mostrato il maggior numero di lesioni. Ad ogni campionamento, tutti i soggetti hanno mostrato lesioni a carico dei sacchi aerei, con comparsa di alterazioni di grado 2 a partire dal 4° giorno p.i. con MS (in 3 animali) e per i successivi due momenti di prelievo (1 soggetto), mentre lesioni di grado 3 sono state osservate in 4 soggetti al termine della prova sperimentale. I polmoni di tutti gli animali hanno mostrato lesioni ad ogni tempo di prelievo (grado 1), con alterazioni classificate come grado 2 una settimana dopo l'inoculo di MS (1 soggetto) e di grado 3 al termine della prova (1 soggetto). In questo gruppo sono state

evidenziate lesioni di grado 3 anche a livello dei turbinati nasali (2 soggetti 11 giorni p.i. con MS) e dei seni infra-orbitali (2 soggetti all'*end-point*).

Valutando nel complesso il punteggio medio attribuito a ciascun organo dell'apparato respiratorio, per gruppo, si può evidenziare come i valori totali più elevati corrispondano a seni nasali, trachea, sacchi aerei, in particolare dei gruppi B e C (Figura 8).

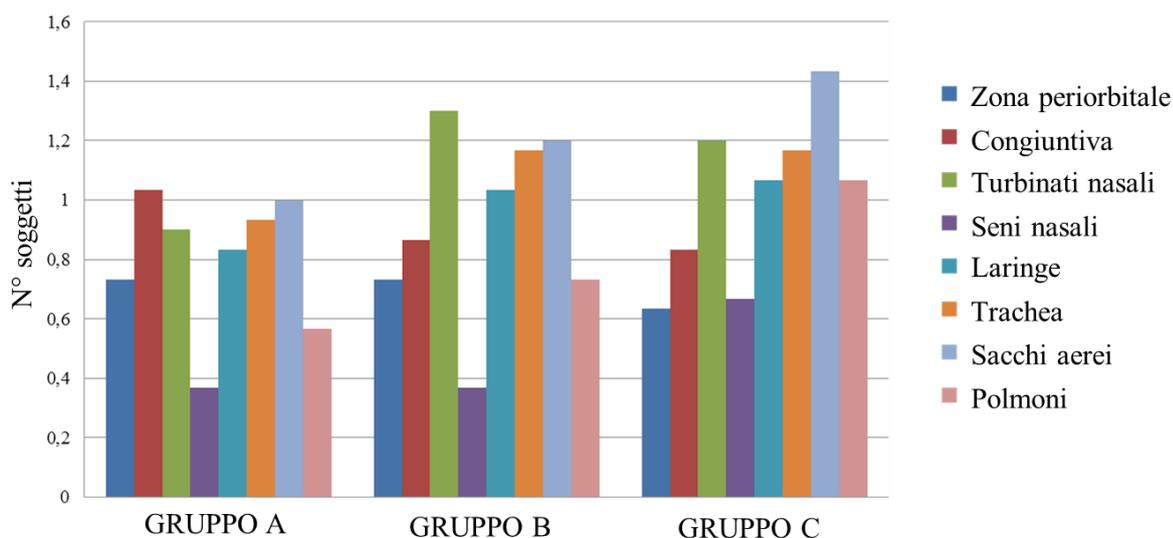


Figura 8. Punteggio medio attribuito alle lesioni macroscopicamente evidenziate in sede necroscopica nei diversi organi nei tre gruppi sperimentali.

Analizzando nel dettaglio questi tre organi in funzione del tempo si può, inoltre, notare come a partire dal 22° giorno di vita e fino al termine della prova sperimentale, gli animali del gruppo C presentino lesioni associate ad un punteggio medio più elevato rispetto al quadro manifestato dal gruppo A e B (Figura 9), inoltre nello stesso gruppo a 35 giorni di vita si può evidenziare un aumento importante del punteggio associato alle lesioni al sacco aereo (punteggio medio oltre 2,5). L'analisi dei punteggi medi relativi ad altri organi dell'apparato respiratorio (polmoni, laringe e congiuntiva) evidenzia che il gruppo C e in secondo luogo il gruppo B presentano in ogni intervallo di tempo un punteggio medio più elevato rispetto a quanto riscontrato nel gruppo A, che tuttavia spicca a 20 giorni di vita per lo *score* medio a livello congiuntivale (Figura 10).

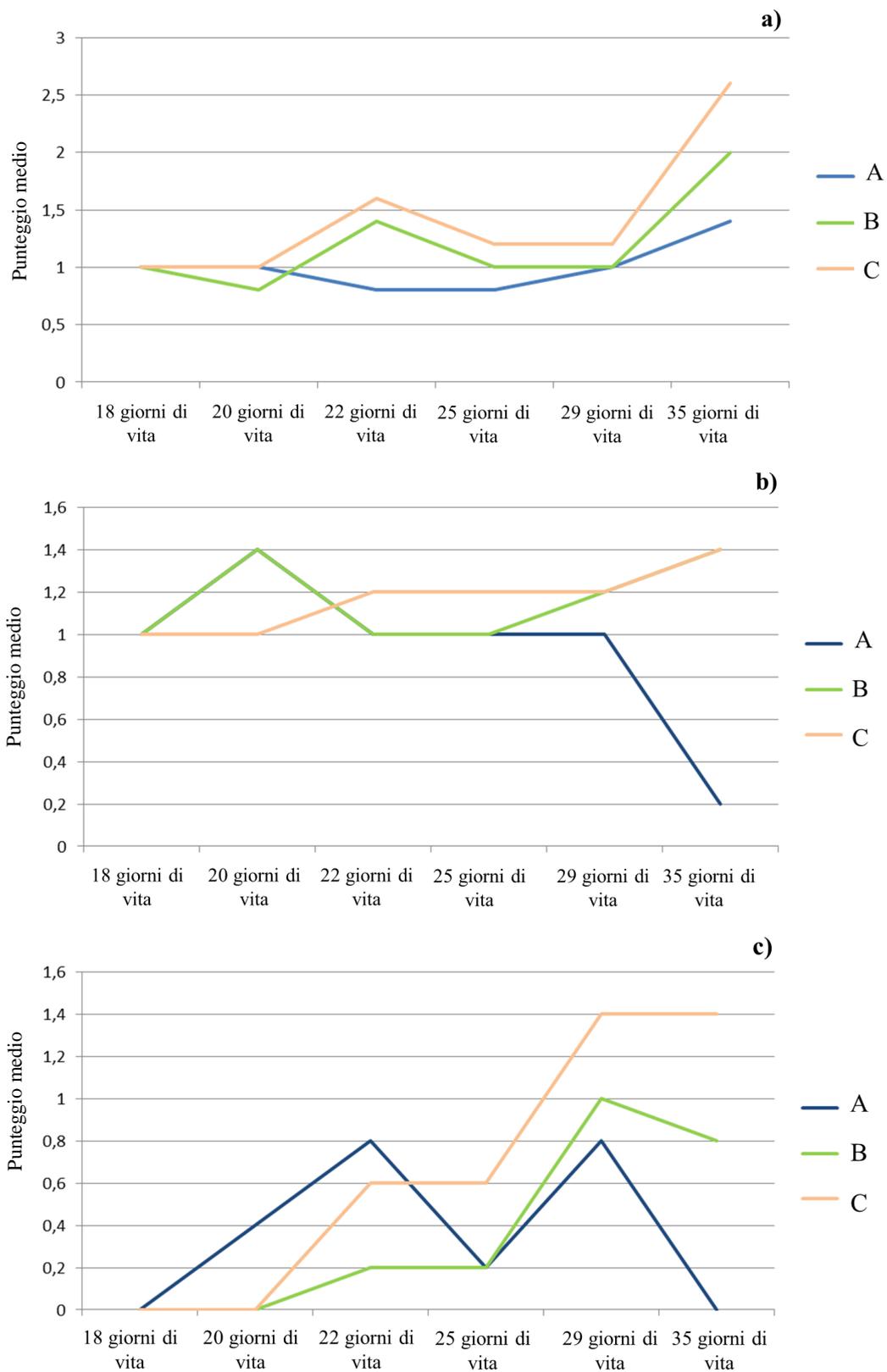


Figura 9. Andamento del punteggio medio di sacco aereo (a), trachea (b) e seni infra-orbitali (c) dei tre gruppi sperimentali nel tempo; il tempo è espresso come giorni di vita degli animali, laddove l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni e con MS a 18.

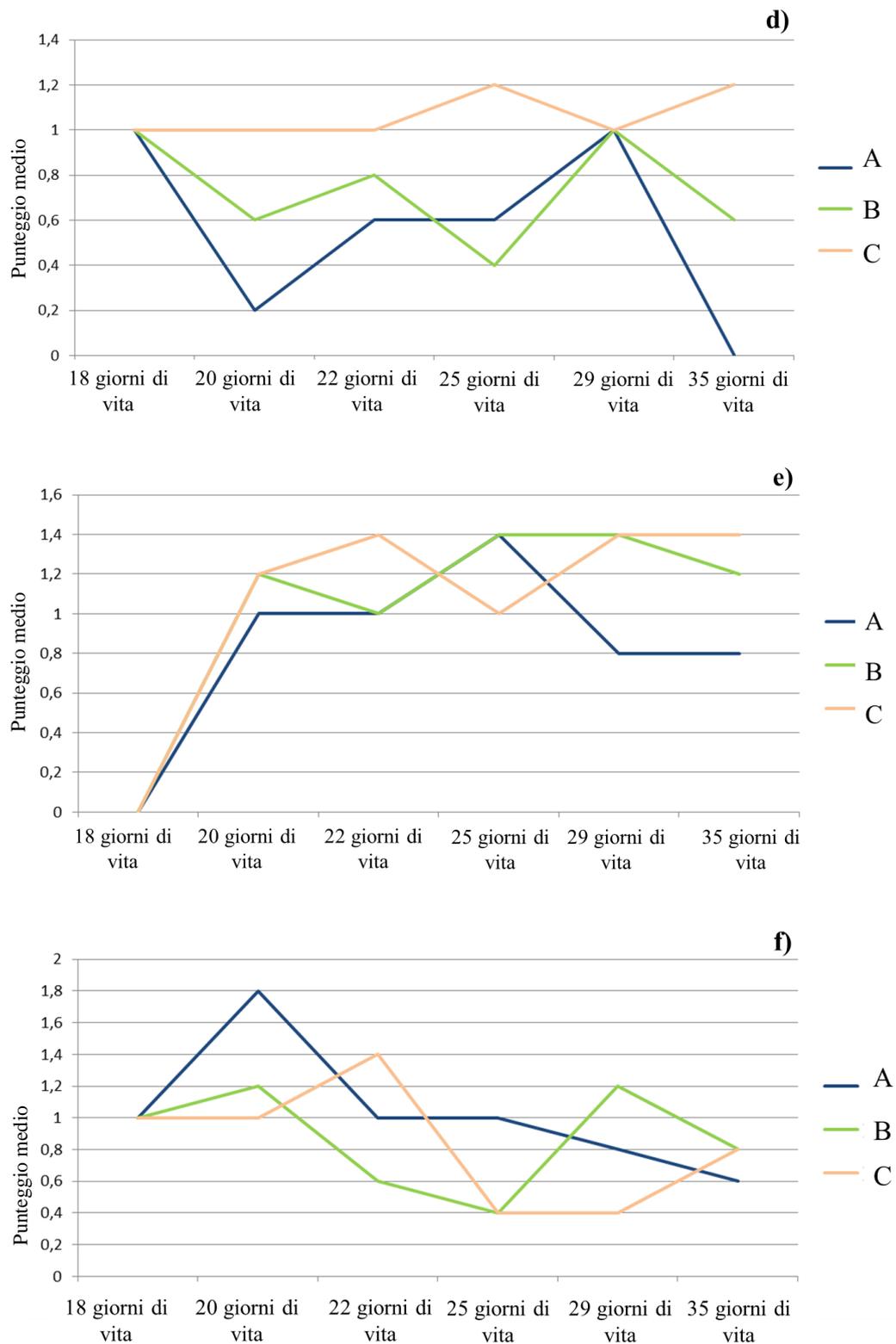


Figura 10. Andamento del punteggio medio di polmoni (d), laringe (e) e congiuntiva (f) del gruppo A, B e C nel tempo; il tempo è espresso come giorni di vita degli animali, laddove l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni e con MS a 18.

Batteriologia

Gli esami batteriologici effettuati in sede necroscopica da milza, polmone, cervello ed articolazione dai cinque soggetti sacrificati per momento di prelievo hanno permesso di escludere la presenza di altri batteri respiratori rilevanti ai fini del presente lavoro.

Isolamento colturale di *Mycoplasma spp.*

Entrambi i tamponi tracheali (gruppo A e B) effettuati all'*end-point* sono risultati positivi all'isolamento colturale per *Mycoplasma spp.* ed identificati come *Mycoplasma synoviae* tramite metodica 16s-rDNA-PCR-DGGE. L'analisi del gene *vlhA* ha permesso di classificare i due campioni come *type F*, confermando l'identità con il ceppo di campo utilizzato per l'infezione sperimentale.

Real-time PCR MS e real-time RT-PCR aMPV

Complessivamente sono stati analizzati 600 campioni in *real-time* RT-qPCR aMPV (gruppo A e B) e 540 in *real-time* PCR MS (gruppo B e C); tale apparente discrepanza numerica è dovuta al fatto che la prima data di prelievo prevista secondo protocollo sperimentale, ossia 3 giorni *post*-infezione con aMPV, coincideva con il momento selezionato per l'inoculo di MS, motivo per cui in tale data sono state eseguite solo le PCR nei confronti dell'agente virale (100 esami); dall'altro lato l'articolazione tibio-tarsica è stata campionata solo per la ricerca di *Mycoplasma synoviae* (40 esami).

I risultati delle RT-qPCR per aMPV nei gruppi A e B sono rappresentati nella figura 11, in cui si può evidenziare come sussistano lievissime differenze nel numero complessivo di campioni positivi e negativi tra gruppo A (aMPV) e gruppo B (aMPV+MS).

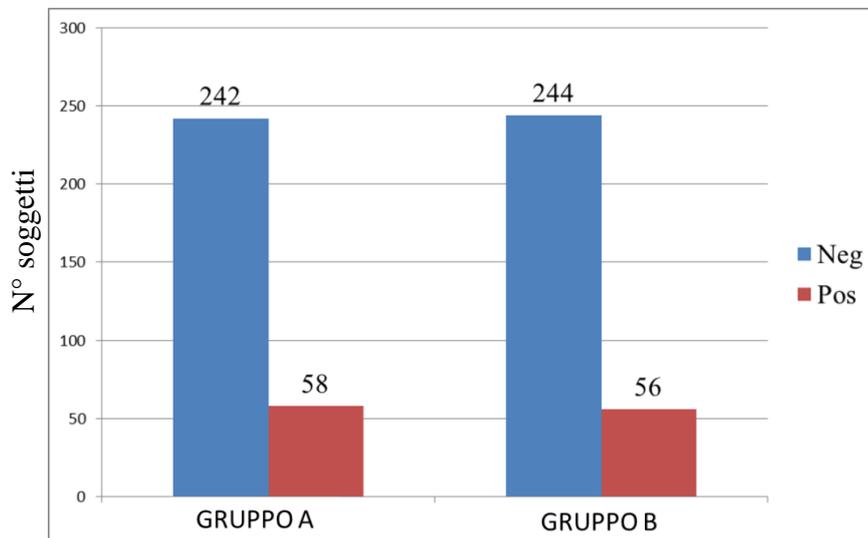


Figura 11. Risultati complessivi delle RT-qPCR aMPV.

Tuttavia, analizzando i risultati positivi in funzione del tempo si può notare come vi sia un differente andamento delle positività: prima dei 7 giorni p.i. il gruppo A presenta un numero superiore di campioni positivi e invece a partire dal 7 fino al 14 giorno p.i. il gruppo B; dal 14° giorno fino alla fine della prova sperimentale i due gruppi presentano un numero uguale di positività (Figura 12).

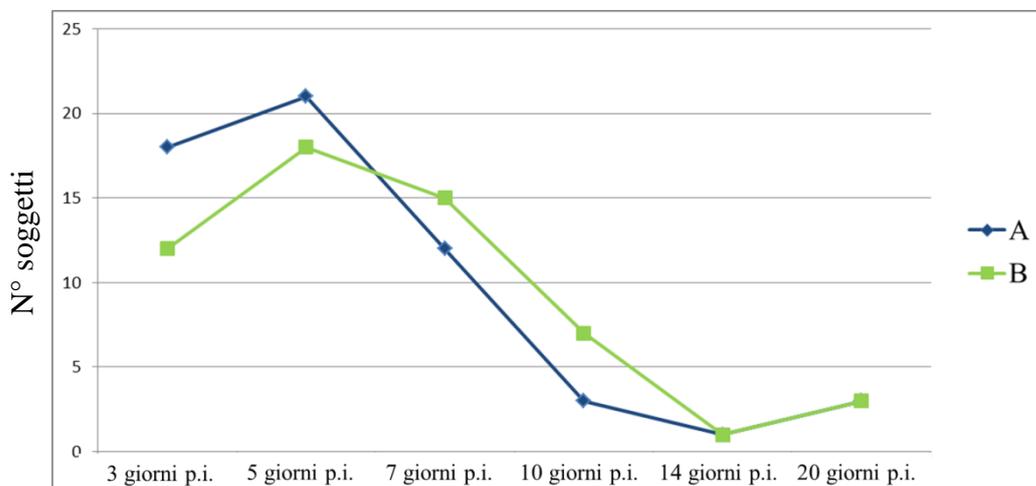


Figura 12. Numero di campioni positivi ad aMPV mediante RT-qPCR nel tempo (le cadenze alle quali sono stati eseguiti i campionamenti sono espresse come giorni *post*-infezione rispetto all'inoculo di aMPV; p.i.=*post*-infezione).

I risultati relativi alle *real-time* PCR per MS sono invece riportati in figura 13, dal quale emerge che il gruppo co-infetto (B), paragonato al gruppo C, ha presentato un maggior numero di campioni positivi a MS.

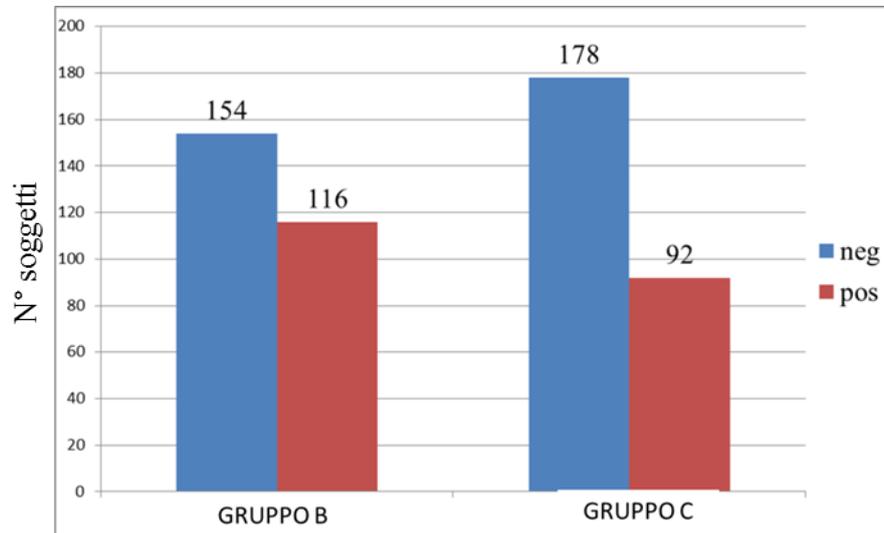


Figura 13. Rappresentazione grafica dei risultati di PCR MS effettuati nel gruppo B e C.

Analizzando i risultati complessivi nel tempo, si può notare come, nel corso della prova sperimentale, il gruppo co-infetto presenti costantemente un numero superiore di campioni positivi per MS, se paragonato al gruppo infettato con il solo agente batterico (Figura 14).

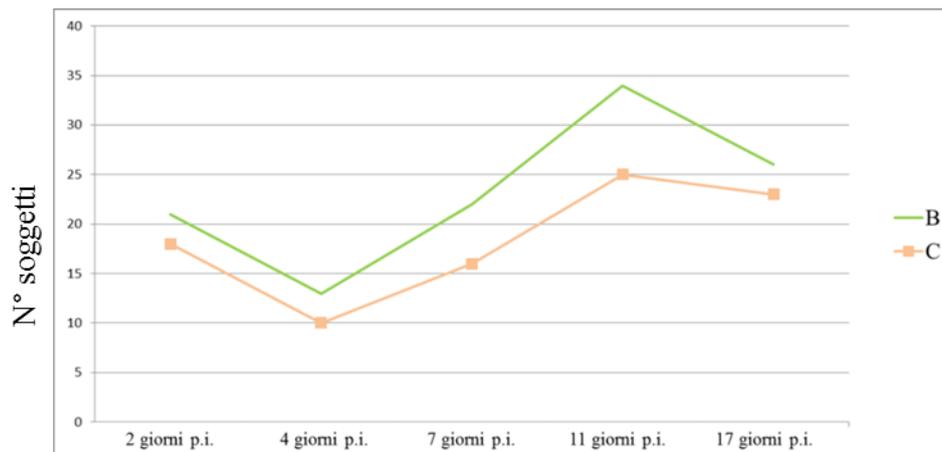


Figura 14. Andamento dei campioni risultati positivi a MS PCR nel tempo (le cadenze sono espresse come giorni *post*-infezione rispetto all'inoculo di MS).

Il numero di soggetti, per organo, risultati positivi a ciascuna metodica in funzione del tempo sono riportati in Appendice 2. I risultati delle *real-time* RT-qPCR aMPV e *real-time* PCR MS relativamente agli organi dell'apparato respiratorio sono rispettivamente rappresentati nella Figura 15 e 16.

Considerando i risultati totali delle RT-qPCR aMPV, il maggior numero di animali positivi si è evidenziato nel gruppo B nei turbinati (23 animali), in secondo luogo in trachea nel gruppo A (18 soggetti) e a livello congiuntivale (15 soggetti); il numero di soggetti positivi da sacco aereo e da polmoni è, invece, risultato esiguo (1-2 animali).

L'andamento dei positivi da congiuntiva non permette di evidenziare differenze sostanziali tra A e B nel numero di soggetti, i quali sono progressivamente andati incontro ad un decremento nel corso della prova sperimentale fino al 29° giorno di vita in cui la positività viene mantenuta solo nel gruppo A. Nei polmoni solo un animale del gruppo A ed uno del gruppo B sono risultati positivi in aMPV RT-qPCR in due distinte cadenze (rispettivamente a 35 e 20 giorni di vita). Il numero di campioni positivi aMPV da sacco aereo è stato esiguo sia in A (1 soggetto a 18 giorni di vita), sia in B (1 soggetto a 18 giorni di vita e 1 a 22 giorni di vita). Per quanto concerne la trachea, tutti i soggetti del gruppo A sono risultati positivi nei primi tre giorni di campionamento e fino al termine della prova è stato identificato almeno un soggetto positivo (gruppo A), mentre nel gruppo B la maggior parte dei campioni positivi è stata riscontrata tra il 18° e il 25° giorno di vita, raggiungendo il picco di 5 animali positivi solo a 5 giorni *post*-infezione con aMPV (20 giorni di vita). I risultati dei turbinati nasali-sinfisi palatina evidenziano, a differenza di quanto espresso dal gruppo a singola infezione, la mantenuta positività delle RT-qPCR aMPV per tutta la durata della prova nel gruppo co-infetto, con la presenza di 3 soggetti positivi anche all'*end-point* (20 giorni *post*-infezione con aMPV). L'andamento nel tempo della media dei valori di *cycle threshold* (ct) dei campioni positivi in RT-qPCR aMPV è riportato in Figura 17, dalla quale si può evidenziare come nella maggior parte dei campionamenti il gruppo B presenti, rispetto al gruppo A, ct medi inferiori (maggiore

quantità di RNA) a livello dei sacchi aerei, della trachea e dei turbinati nasali-sinfisi palatina. In aggiunta, il più basso valore medio di ct è stato identificato dai turbinati nasali del gruppo B ed A a 20 giorni di vita. Per quanto concerne i risultati delle PCR MS, il maggior numero di soggetti positivi è stato osservato in congiuntiva (25 animali in B e C), trachea (23 animali in B e 20 in C) e turbinati nasali-sinfisi palatina (23 animali in B e 20 in C). Analizzando i risultati dei due gruppi nel tempo si può evidenziare come tutti gli animali di B e C siano sempre risultati positivi in congiuntiva. Il sacco aereo si è positivizzato dapprima nel gruppo infettato solo con MS (dal 22° giorno di vita degli animali al termine della prova) ed in seguito nel gruppo co-infetto (29 e 35 giorni di vita).

I polmoni solo risultati positivi in tutti i momenti di campionamento nel caso del gruppo B, raggiungendo la totalità di animali positivi 7 giorni dopo l'inoculo di MS; al contrario, le positività da questo organo nel gruppo C sono state a 20, 29 e 35 giorni di vita. Le PCR MS da trachea hanno presentato risultati analoghi tra il gruppo B e il gruppo C (5 animali positivi su 5 a 2-7-11-17 giorni *post*-infezione con MS), ma solo nel gruppo co-infetto (3 animali) è stata evidenziata positività in PCR 4 giorni *post*-infezione con l'agente batterico. In modo simile a quanto presentato a livello tracheale, anche i risultati delle PCR MS da turbinati nasali hanno mostrato risultati paragonabili tra il gruppo B e il C, ma solo nel gruppo co-infetto è stata rilevata positività (3 animali) 4 giorni *post*-infezione con l'agente batterico.

L'andamento nel tempo della media dei valori di *cycle threshold* (ct) dei campioni positivi in PCR MS è riportato nella Figura 18 e in dettaglio per ciascun organo dell'apparato respiratorio in Appendice 4. Il valore medio di ct da tampone congiuntivale presenta variazioni di piccola entità nell'arco della prova; al contrario, i valori medi di ct da trachea e da turbinati nasali-sinfisi palatina del gruppo co-infetto risultano sistematicamente inferiori (maggiore quantità di DNA) rispetto al gruppo C.

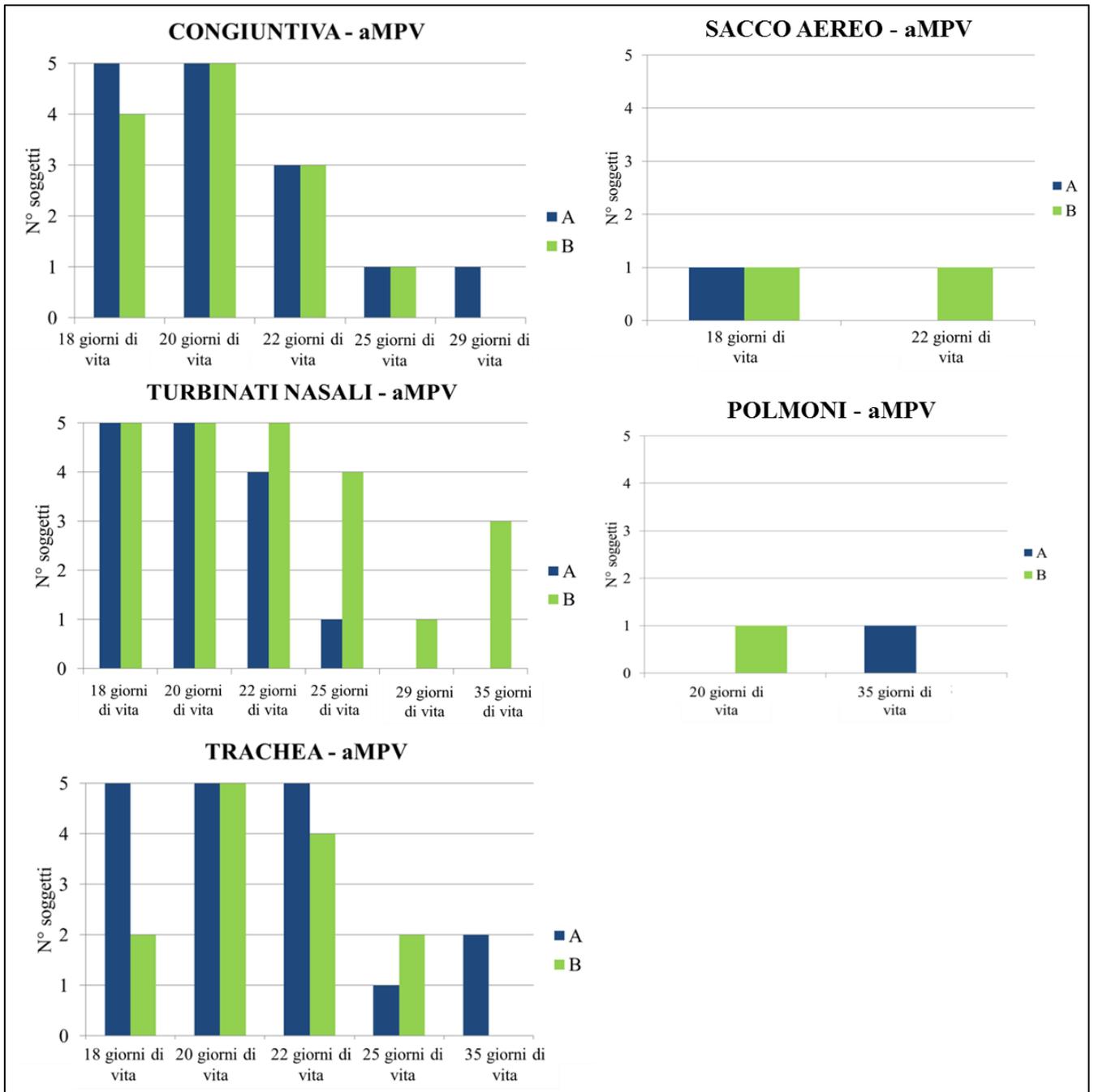


Figura 15. Numero di soggetti positivi (gruppo A e B) in RT-qPCR aMPV da organi dell'apparato respiratorio nel tempo (le cadenze sono espresse come giorni di vita degli animali, laddove l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni, mentre quella con MS a 18).

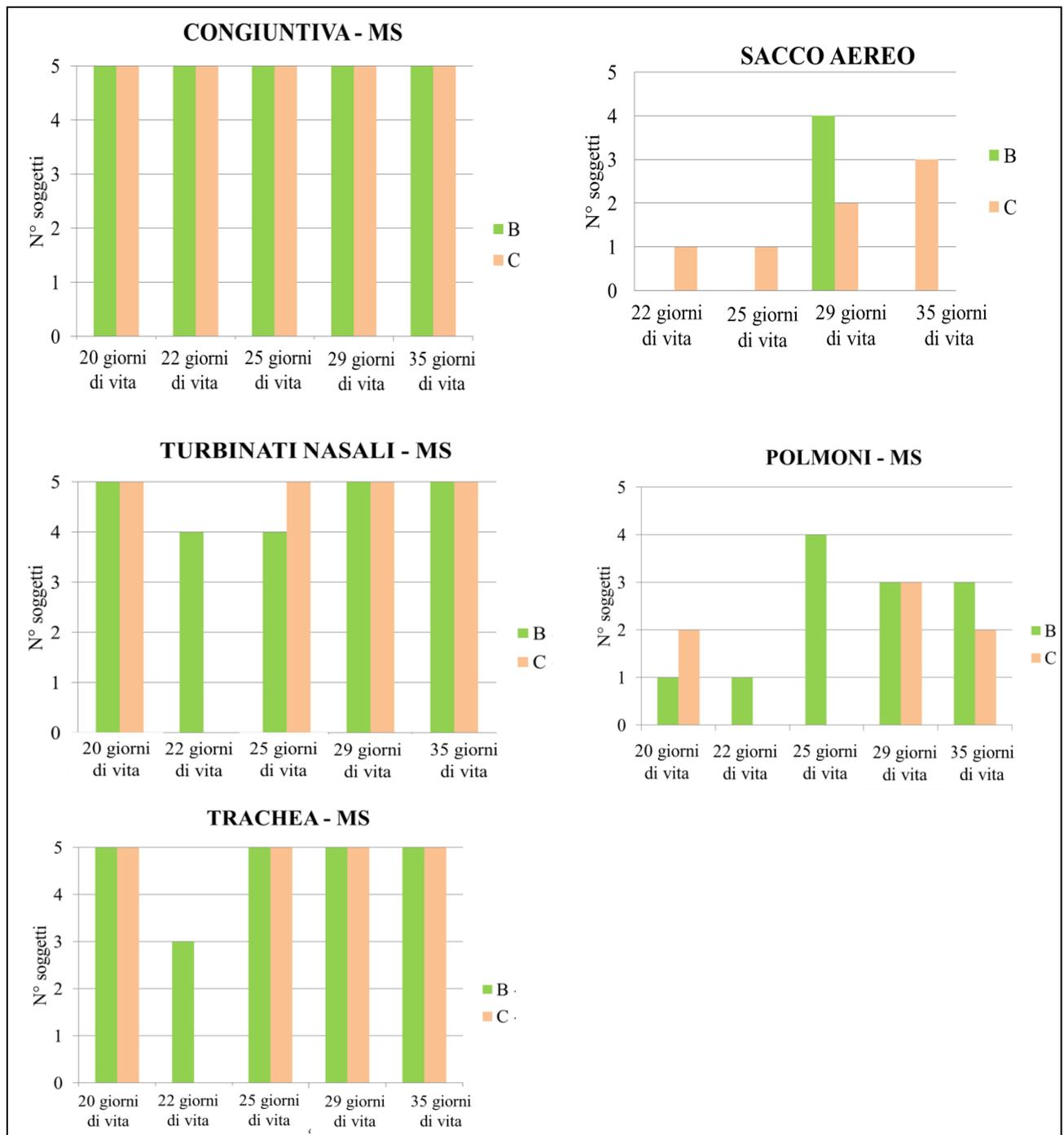


Figura 16. Numero di soggetti positivi (gruppo B e C) in PCR MS da organi dell'apparato respiratorio nel tempo (le cadenze sono espresse come giorni di vita degli animali, laddove l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni, mentre quella con MS a 18).

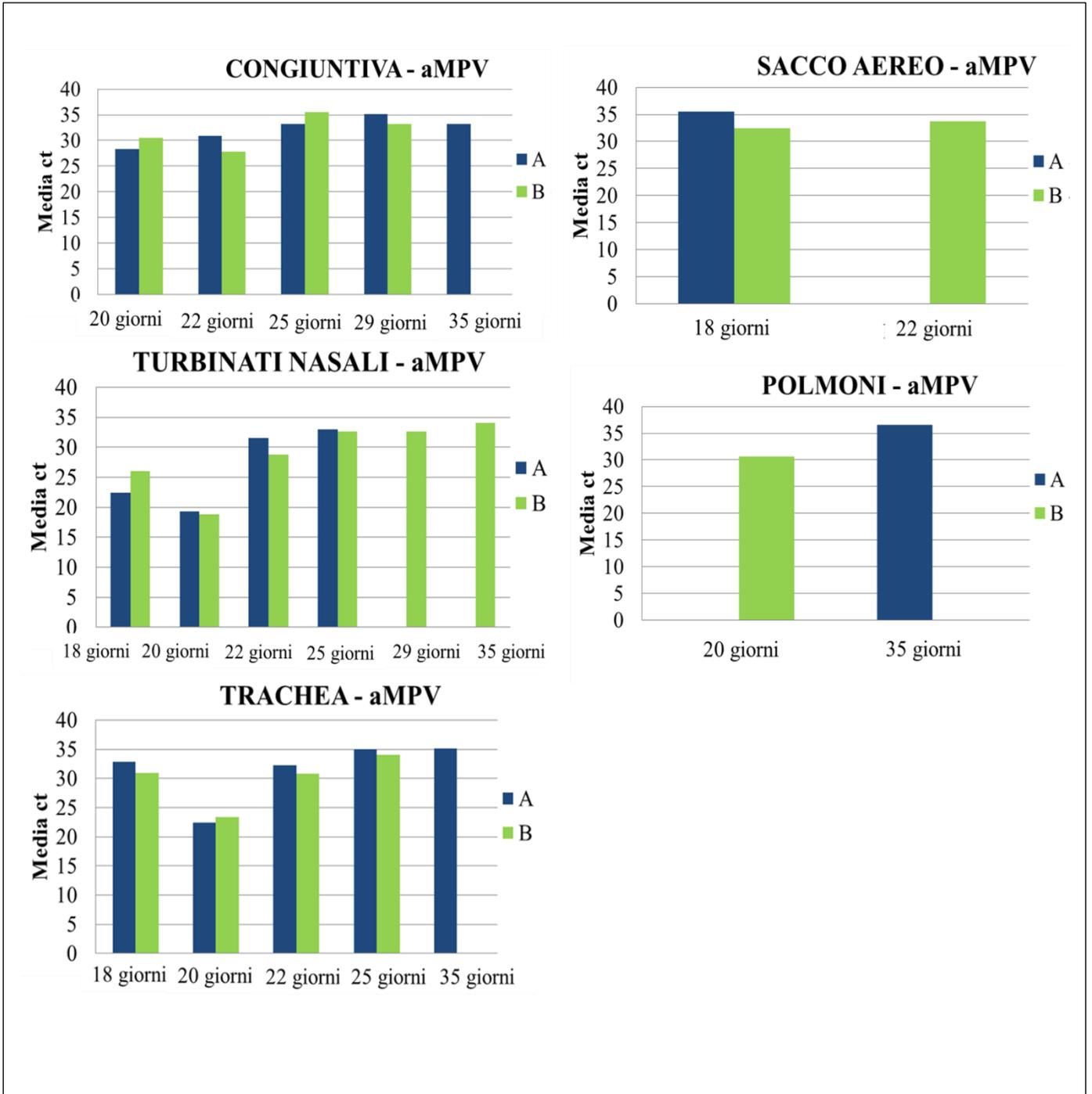


Figura 17. Rappresentazione grafica dei risultati relativi ai ct delle PCR RT-qPCR aMPV nei gruppi A e B per ciascun organo dell'apparato respiratorio; l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni di vita e quella con MS a 18 giorni di vita.



Figura 18. Rappresentazione grafica dei risultati relativi ai ct delle real-time PCR MS nei gruppi B e C per ciascun organo dell'apparato respiratorio; l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni di vita e quella con MS a 18 giorni di vita.

Per quanto concerne i risultati delle RT-qPCR aMPV da organi “non dell’apparato respiratorio” (Figura 19) sia nel gruppo A che nel gruppo B i campioni positivi, seppur in numero esiguo, si sono concentrati all’interno dei primi 7 giorni *post*-infezione. Il gruppo A ha mostrato sporadiche positività da cervello, milza, rene e tampone cloacale; al contrario, il gruppo B ha presentato un numero inferiore di animali e di organi positivi nel tempo (solo milza e cloaca in due soggetti). I valori di ct medi osservati in questi organi sono riportati in Figura 20.

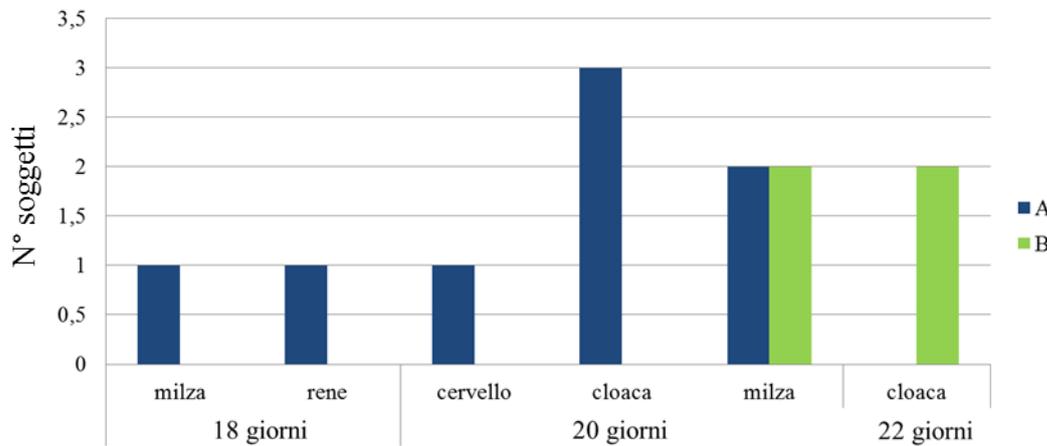


Figura 19. Numero di soggetti positivi (gruppo A e B) as aMPV da organi non di pertinenza respiratoria nel tempo; le cadenze sono espresse come giorni di vita degli animali, la dove l’infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni.

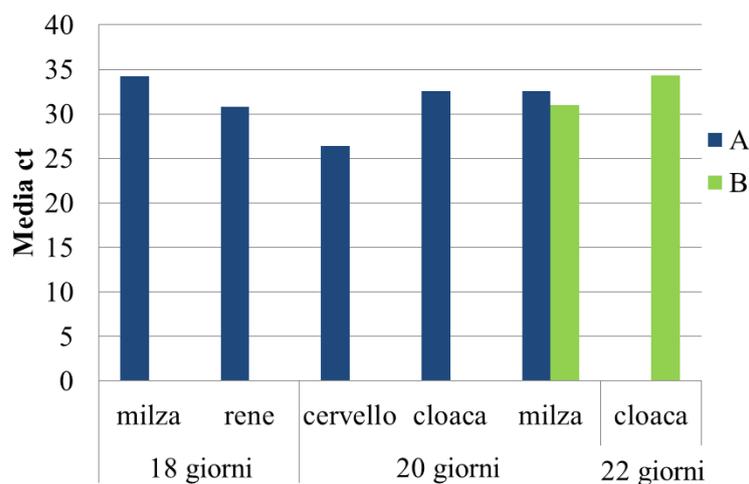


Figura 20. Andamento medio dei ct relativi alle RT-qPCR aMPV risultate positive da organi non di pertinenza respiratoria nei gruppi A e B.

Un numero maggiore di positività e di organi positivi per MS sono stati osservati nel gruppo co-infetto (Figura 21). Nel solo gruppo B infatti sono state osservate positività da tonsille cecali. Infine, il gruppo co-infetto ha mostrato valori medi di ct inferiori rispetto al gruppo C in cervello, cloaca e rene (Figura 22).

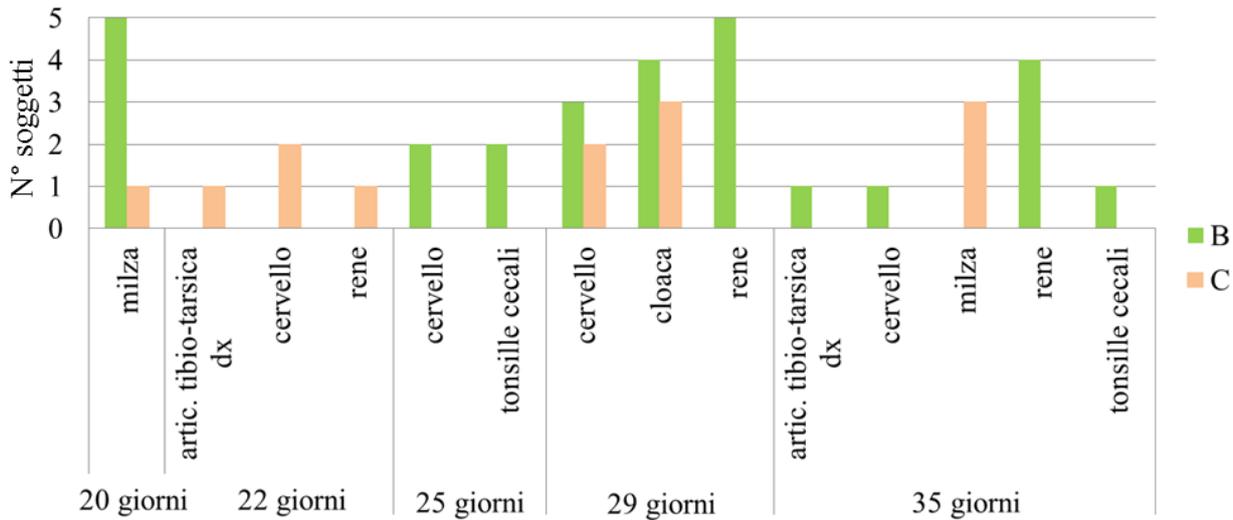


Figura 21. Numero di soggetti positivi (gruppo B e C) in *real-time* PCR MS da organi non di pertinenza respiratoria nel tempo; le cadenze sono espresse come giorni di vita degli animali, la dove l'infezione con MS a 18.

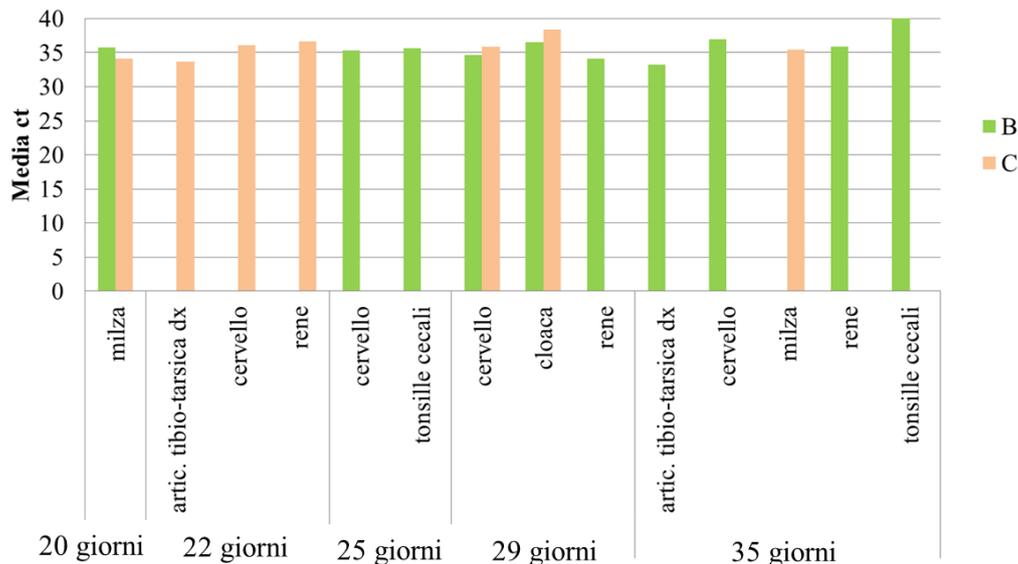


Figura 22. Andamento medio dei ct relativi alle *real-time* PCR MS risultate positive da organi non di pertinenza respiratoria nei gruppi B e C.

Infine, i campioni in cui è stata riconosciuta una positività ad entrambe le metodiche utilizzate (gruppo B) sono stati 38, distribuiti nei seguenti organi: congiuntiva (9), milza (2), polmone (1), trachea (9) e turbinati nasali-sinfisi palatina (17). Analizzando nel complesso l'andamento dei valori medi dei ct delle RT-qPCR aMPV e *real-time* PCR MS di questi organi si può evincere che fino a 20 giorni di vita (5 giorni p.i. con aMPV) la quantità di agente virale rilevata risulta superiore rispetto ad MS, al contrario in seguito il quadro espresso è esattamente opposto, con ct medi di PCR MS molto inferiori rispetto ad aMPV in tutti gli organi considerati (Figura 23).

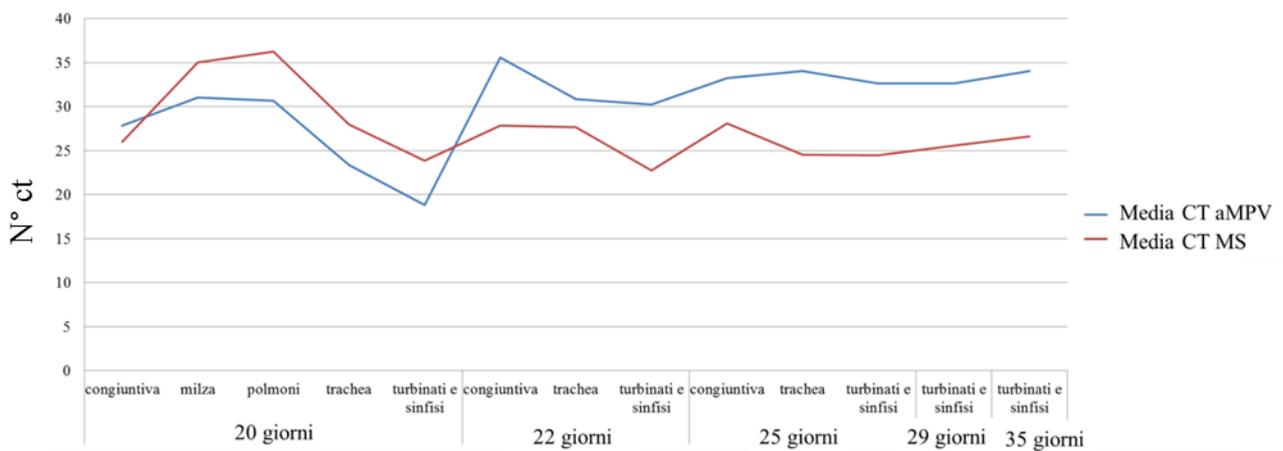


Figura 23. Andamento nel tempo dei valori medi di ct dei campioni positivi sia in PCR aMPV, sia in PCR MS (gruppo B); le cadenze sono espresse come giorni di vita degli animali, la dove l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni, mentre quella con MS a 18.

2.5 DISCUSSIONE

Nel presente studio ci si è riproposti di riprodurre sperimentalmente l'infezione da *Metapneumovirus* aviare nel *broiler*, mimando il più possibile le condizioni di campo, ragione per cui l'agente virale, ceppo di campo isolato da pollo con sintomatologia di tipo respiratorio, è stato inoculato per via oculo-congiuntivale a 15 giorni di vita. La scarsità della letteratura scientifica nell'ambito dell'infezione sperimentale da aMPV nel pollo e l'aumentata rilevanza epidemiologica in quest'ospite hanno portato alla scelta di questa specie come modello sperimentale.

La riproduzione sperimentale dell'infezione (gruppo A) è testimoniata sia dai risultati dell'esame clinico e anatomo-patologico, sia dai dati di tipo laboratoristico (sierologia e PCR). Nonostante la presenza di aMPV non sia sempre stata associata a manifestazioni cliniche, nel presente studio gli animali hanno manifestato sintomatologia di tipo respiratorio a partire da 3 giorni a 19 giorni p.i. caratterizzata prevalentemente da congiuntivite, edema peri-palpebrale e fame d'aria, per un periodo superiore rispetto a quanto descritto da altri autori (Majo *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998; Aung *et al.*, 2008 e Garaibeh e Shamoun, 2012). È importante sottolineare come sia stata evidenziato il sintomo "testa gonfia" anche nel gruppo infettato con il solo agente virale (gruppo A). Il buon esito dell'infezione sperimentale in presenza di SHS potrebbe essere supportato dal ceppo virale utilizzato, isolato dalla medesima specie, dal momento di infezione e dalla via di inoculo, che potrebbero essere i fattori discriminanti rispetto a durata della prova e dose infettante che sono paragonabili agli altri studi sperimentali effettuati nel pollo o nel tacchino con differenti specie batteriche (Cook *et al.*, 1991; Catelli *et al.*, 1998; Naylor *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 1998; Aung *et al.*, 2008). Inoltre il ceppo utilizzato risulta essere di più recente isolamento e da studi di analisi

filogenetica si è visto come sia andato incontro ad una evoluzione (Cecchinato *et al.*, 2010) che potrebbe aver aumentato l'adattamento del patogeno alla specie pollo o semplicemente aumentato la virulenza. In aggiunta, in sede necroscopica sono state evidenziate lesioni non solo a carico dell'apparato respiratorio superiore ma anche in sacchi aerei e polmoni, a differenza di quanto descritto da altri autori (Aung *et al.*, 2008); tali evidenze sono inoltre supportate dai risultati microbiologici che hanno potuto escludere la concomitante presenza di altri patogeni respiratori di origine batterica (es. *E. coli*).

La valutazione dei risultati delle RT-qPCR evidenziano una prima colonizzazione delle vie aeree superiori (organi *target*), seguita da uno stato viremico tra il 3°-5° giorno *post*-infezione, dato supportato dalla positività per aMPV da organi quali milza, rene, cervello e cloaca. Gli animali del gruppo A hanno mostrato sieroconversione a partire da 10 giorni p.i. e fino al termine della prova; sebbene alcuni soggetti siano risultati negativi in sierologia, i risultati delle RT-qPCR eseguite dai diversi organi di ciascun soggetto dimostrano la costante e diffusa presenza nel tempo dell'antigene virale.

La non-omogenea sieroconversione negli animali potrebbe essere spiegata dalla minore risposta immunitaria che è stata segnalata in questa specie (Cook e Cavanagh, 2010), in particolare in animali con ciclo produttivo breve (Garaibeh e Algharaibeh, 2007), o da possibili variazioni in termini di specificità legate all'antigene utilizzato per l'allestimento del *kit* commerciale (sottotipo, specie di isolamento, origine geografica, anno di isolamento). A tal riguardo è importante sottolineare nuovamente come sia stata osservata da alcuni autori un'evoluzione nel tempo dei ceppi di aMPV circolanti in Italia, legata a cambiamenti nelle proteine G e/o SH (Catelli *et al.*, 2010; Cecchinato *et al.*, 2010) e quindi l'aver utilizzato per l'infezione sperimentale un ceppo diverso dal punto di vista genetico rispetto al *kit* ELISA potrebbe aver influenzato l'esito della sierologia.

Nel presente studio ci si è inoltre proposti di valutare nel *broiler* la possibile interazione tra aMPV e *Mycoplasma synoviae*, indagando la loro diffusione nei diversi gruppi sperimentali tramite *real-time* PCR specifiche. Al fine di mimare un'azione virale di "apripista" nei confronti di un agente batterico secondario (Kleven, 1998; Landman e Feberwee, 2004; Ley, 2008), l'inoculo di aMPV ha preceduto di 3 giorni quello di MS. Anche per *Mycoplasma synoviae*, con l'obiettivo di riprodurre il più possibile le condizioni di infezione naturale, si è scelta la via oculo-congiuntivale, considerata non convenzionale in corso di infezione sperimentale con *Mycoplasma spp.*

Nel gruppo infettato con solo MS (gruppo C) i primi sintomi si sono sviluppati a partire da 3 giorni p.i. (fame d'aria e blefarite) e tra il 5° e 16° giorno p.i. gli animali hanno presentato evidente sintomatologia caratterizzata da edema peri-palpebrale, congiuntivite, respirazione difficoltosa e stato di depressione con apatia ed inappetenza.

All'infezione è seguita un'immediata colonizzazione delle vie aeree superiori (congiuntiva, turbinati, trachea) e a partire da 2 giorni p.i. di distretti più profondi quali milza, rene, cervello, articolazione tibio-tarsica e cloaca. Il 100% degli animali ha siero-convertito in SAR a partire dal 29° giorno di vita (11 giorni p.i.), mentre in ELISA sono state osservate rare positività all'*end-point* (17giorni p.i.); questi risultati confermano il buon esito della via di infezione oculo-congiuntivale per *Mycoplasma synoviae*. Inoltre, al termine della prova si è eseguito il re-isolamento colturale per *Mycoplasma synoviae* a partire da tamponi tracheali (gruppo C e B), confermando la sua prolungata presenza all'interno dell'ospite.

Di seguito si riportano delle valutazioni comparative tra i gruppi infettati con singolo agente e il gruppo co-infetto. Mettendo a confronto il gruppo A (aMPV) e B (aMPV+MS) si osserva una sintomatologia clinica simile, ma più conclamata e prolungata nel tempo nel gruppo co-infetto, in particolare per i sintomi edema peri-palpebrale e testa gonfia. Nell'arco dello studio sperimentale il segno "scolo nasale" è stato evidenziato unicamente nel gruppo B, mentre è stato riportato come

uno dei pochi segni clinici manifestati in infezioni sperimentali da aMPV nella specie pollo (Majo *et al.*, 1995; Catelli *et al.*, 1998).

La sieroconversione nei confronti dell'agente virale è avvenuta a partire dal 25° giorno di vita in entrambi i gruppi e in tale periodo vi è stata una drastica diminuzione del numero di organi afferenti all'apparato respiratorio superiore positivi in PCR per aMPV (turbinati, trachea e congiuntiva).

Sulla base di quanto espresso dai risultati delle PCR aMPV dagli organi dell'apparato respiratorio superiore si può evidenziare come in congiuntiva e trachea la presenza dell'agente virale venga mantenuta fino all'*end-point* solo nel gruppo A (aMPV); al contrario in tali distretti nel gruppo B l'agente virale non risulta più rilevabile a 35 giorni di vita, suggerendo una possibile correlazione negativa tra la concomitante infezione batterica e la presenza di aMPV in questi tessuti. Tuttavia, sia a carico della congiuntiva che della trachea lo *score* medio delle lesioni rilevate in sede autoptica risulta superiore nel gruppo co-infetto a 35 giorni di vita.

A differenza di quanto osservato in congiuntiva e trachea, le PCR aMPV effettuate dai turbinati nasali nel gruppo co-infetto (B) sono risultate positive per l'intera durata della prova e con quantità di RNA maggiori rispetto al gruppo infettato con il solo agente virale; è interessante evidenziare che il segno "scolo nasale" si rileva unicamente in questo gruppo tra 21 e 30 giorni di vita. Inoltre, nel gruppo B è stato osservato un numero superiore di animali presentanti lesioni macroscopiche a carico dei turbinati nasali e con punteggio medio più alto e infine il segno clinico "testa gonfia" è stato osservato in un numero considerevolmente superiore di animali. Questi dati potrebbero suggerire il possibile ruolo anche di *Mycoplasma synoviae* nello sviluppo di SHS, per quanto anche nel gruppo infettato con il singolo agente si sia evidenziata "testa gonfia", ma in un numero inferiore di animali e soprattutto in assenza di infezioni batteriche secondarie (*E. coli*) fattore considerato un requisito necessario per lo sviluppo di tale sintomatologia (Jones e Rautenschlein, 2013).

Confrontando i dati relativi alla diffusione sistemica di aMPV nei due gruppi si osserva in alcuni soggetti del gruppo A una precoce e limitata nel tempo colonizzazione (3-5 giorni p.i.) di distretti profondi quali milza, rene, cervello e cloaca; nel gruppo co-infetto solo due soggetti hanno presentato una positività più tardiva in cloaca e milza (5 e 7 giorni p.i.). Tali dati evidenziano una minore capacità di diffusione di aMPV in organi periferici in compresenza di *Mycoplasma synoviae* in modo simile a quanto descritto da Naylor et al. (1992) per aMPV e *Mycoplasma gallisepticum*. I meccanismi alla base di tale comportamento rimangono ignoti ma studi di immuno-patogenesi potrebbero essere utili nel chiarire quanto evidenziato con il presente studio.

Mettendo a confronto il gruppo infettato con MS (gruppo C) e quello con aMPV+MS (gruppo B) si osserva una sintomatologia simile e un sovrapponibile numero di animali colpiti nel tempo. Il primo segno rilevabile è risultato la congiuntivite, seguita da blefarite, edema peri-palpebrale e fame d'aria. Il segno "respirazione difficoltosa" è stato rilevato nel solo gruppo C dal 13° p.i. fino all'*end-point* (16 giorni p.i.), tale dato potrebbe essere avvalorato dal maggior numero di PCR positive da sacco aereo nel gruppo infettato con solo MS e dalla maggiore gravità delle lesioni a carico di questo tessuto in sede necroscopica. Nel gruppo C non sono stati rilevati i segni scolo nasale e testa gonfia, a supporto dei dati precedentemente discussi per i gruppi A e B.

L'avvenuta sierconversione nei confronti di MS è dimostrata in entrambi i gruppi dalla totale positività (100% degli animali) in SAR a 29 giorni di vita (11 giorni p.i. con MS) e se da pur rari risultati positivi al test ELISA.

E' interessante notare come al momento della sierconversione il segno congiuntivite, precocemente comparso, non risulti più rilevabile in entrambi i gruppi fino al termine della prova sperimentale.

Valutando le positività in PCR per MS nei diversi organi, si rileva che in trachea, turbinati e congiuntiva la maggior parte dei campionamenti è risultata positiva in B e in C, ma con valori medi

di ct inferiori nel gruppo co-infetto, esprimendo quindi la presenza di una maggiore quantità di DNA batterico.

L'analisi dei risultati da sacco aereo confermano l'azione *target* di MS nei confronti di questo tessuto (gruppo C), suggerendo in modo inatteso che la compresenza dell'agente virale non ne favorisce la sua colonizzazione. Al contrario, a livello polmonare si osserva un maggior numero di soggetti positivi in PCR MS nel gruppo co-infetto (B), attribuendo in questo caso un possibile ruolo di apripista ad aMPV.

E' interessante notare come in tutti gli organi dell'apparato respiratorio (turbinati nasali, trachea, congiuntiva, sacco aereo e polmone) si assista ad una marcata e protratta positività per *Mycoplasma synoviae* in entrambi i gruppi e fino all'*end-point*. Un prolungamento della prova sperimentale avrebbe consentito ulteriori osservazioni, utili a chiarire diffusione e dinamica dell'infezione nel tempo (cronicizzazione) evidenziando eventuali ulteriori differenze tra i gruppi.

Confrontando i dati relativi alla diffusione sistemica di MS nei due gruppi si osserva a partire da 2 giorni p.i. il coinvolgimento della milza e successivamente (4 giorni p.i.) positività in altri organi quali cervello, rene, articolazione tibio-tarsica, tonsille cecali e cloaca. In dettaglio, le positività riscontrate a 22 giorni di vita (4 giorni p.i.) sono attribuibili al solo gruppo C (MS) e in tale data di prelievo si è osservata inaspettatamente una negatività a livello dei tessuti *target* (turbinati e trachea). Questi dati suggeriscono un possibile confinamento di *Mycoplasma synoviae* nella sede di infezione e replicazione seguito quindi da setticemia con colonizzazione secondaria di organi sistemici. Valutando i dati espressi dal gruppo co-infetto si nota invece una protratta positività in organi considerati "non *target*" fino all'*end-point*, associata inoltre a valori medi di ct inferiori rispetto al gruppo C, nello specifico per cervello, cloaca e rene.

In particolare risulta interessante il tropismo di MS nei confronti del SNC e del parenchima renale. Per quest'ultimo organo la positività sembra essere associata alla diffusione del patogeno per via

ematica e non alla contiguità anatomica con i sacchi aerei, che sono risultati negativi a 35 giorni di vita.

Tali dati suggeriscono come, in modo simile a quanto descritto nel tacchino per altri agenti batterici (Cook et al., 1991; Naylor *et al.*, 1992), il *Metapneumovirus* possa aver svolto un ruolo di apripista a *Mycoplasma synoviae*, permettendone una maggiore diffusione sistemica sia in termini quantitativi che temporali.

2.6 APPENDICI

Appendice 1. Sintomatologia espressa nel tempo dagli animali dei gruppi sperimentali A (aMPV), B (aMPV+MS) e C (MS), espressa come numero di soggetti positivi sul totale o come presenza (SI) e assenza (NO) nel caso di “depressione/letargia”.

Isolatore	Giorni p.i. aMPV	Giorni p.i. MS	Fame d'aria	Respirazione difficoltosa	Testa gonfia	Scolo nasale	Edema peri-palpebrale	Blefarite	Congiuntivite	Depressione/letargia
A	2	0	0/30	0/30	0/30	0/30	3/30	0/30	0/30	NO
A	3	0	0/25	0/25	0/25	0/25	5/25	0/25	0/25	NO
A	4	1	0/25	0/25	0/25	0/25	8/25	0/25	8/25	NO
A	5	2	0/25	0/25	0/25	0/25	6/25	0/25	6/25	NO
A	6	3	0/20	0/20	0/20	0/20	7/20	0/20	0/20	NO
A	8	5	2/15	0/15	2/15	0/15	0/15	0/15	1/15	NO
A	9	6	0/15	0/15	2/15	0/15	1/15	0/15	3/15	NO
A	10	7	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	NO
A	11	8	2/10	0/10	0/10	0/10	6/10	0/10	2/10	SI
A	12	9	3/10	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	2/10	NO
A	13	10	6/10	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	1/10	SI
A	14	11	3/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	NO

A	15	12	3/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	NO
A	16	13	2/5	0/5	2/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	NO
A	17	14	2/5	0/5	2/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	NO
A	18	15	2/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	NO
A	19	16	2/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	0/5	NO
B	2	0	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	NO
B	3	0	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	NO
B	4	1	0/25	0/25	0/25	0/25	8/25	0/25	8/25	8/25	NO
B	5	2	0/25	0/25	0/25	0/25	6/25	0/25	6/25	6/25	NO
B	6	3	0/20	0/20	0/20	1/20	4/20	6/20	0/20	0/20	NO
B	8	5	1/15	0/15	7/15	0/15	0/15	0/15	3/15	3/15	SI
B	9	6	3/15	0/15	8/15	0/15	0/15	0/15	3/15	3/15	NO
B	10	7	2/10	0/10	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	SI
B	11	8	3/10	0/10	0/10	1/10	5/10	0/10	3/10	3/10	NO
B	12	9	6/10	0/10	0/10	1/10	4/10	0/10	2/10	2/10	SI
B	13	10	3/10	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	1/10	1/10	SI

B	14	11	2/5	0/5	1/5	3/5	3/5	0/5	0/5	NO
B	15	12	2/5	0/5	1/5	3/5	3/5	0/5	0/5	NO
B	16	13	3/5	0/5	2/5	0/5	1/5	0/5	0/5	NO
B	17	14	3/5	0/5	2/5	0/5	1/5	0/5	0/5	NO
B	18	15	3/5	1/5	3/5	0/5	2/5	0/5	0/5	NO
B	19	16	2/5	1/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	NO
C	2	0	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	0/30	NO
C	3	0	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	NO
C	4	1	0/25	0/25	0/25	0/25	4/25	0/25	4/25	NO
C	5	2	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	NO
C	6	3	1/20	0/20	0/20	0/20	0/20	5/20	0/20	NO
C	8	5	0/15	0/15	0/15	0/15	1/15	0/15	9/15	SI
C	9	6	0/15	3/15	0/15	0/15	3/15	0/15	12/15	SI
C	10	7	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	5/10	5/10	SI
C	11	8	1/10	0/10	0/10	0/10	4/10	0/10	3/10	NO
C	12	9	3/10	0/10	0/10	0/10	3/10	0/10	2/10	SI

C	13	10	4/10	0/10	0/10	0/10	5/10	0/10	2/10	NO
C	14	11	2/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	SI
C	15	12	2/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	SI
C	16	13	3/5	2/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	SI
C	17	14	3/5	2/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	SI
C	18	15	3/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5	0/5	NO
C	19	16	3/5	2/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5	SI

Appendice 2. Risultati dei reperti macroscopici rilevati in sede autoptica e relativo punteggio assegnato per ciascun organo dell'apparato respiratorio e gruppo(A, B e C) in funzione del tempo (i risultati sono espressi come numero di soggetti sul totale pari a 5 animali).

		Organo															
		Congiuntiva				Turbinati nasali				Seni nasali				Regione peri-orbitale			
Età degli animali	Gruppo	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
18 giorni	A	0/5	5/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	C	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	B	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
20 giorni	A	0/5	1/5	4/5	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	C	0/5	5/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5
	B	0/5	2/5	3/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5
22 giorni	A	3/5	1/5	1/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	3/5	2/8	0/5	0/5
	C	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	1/5	4/5	0/5	3/5	1/5	1/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5
	B	2/5	3/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	3/5	1/5	1/5	0/5
25 giorni	A	1/5	3/5	1/5	0/5	2/5	1/5	2/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5
	C	3/5	2/5	0/5	0/5	3/5	1/5	1/5	0/5	2/5	3/5	0/5	0/5	2/5	3/5	0/5	0/5
	B	3/5	2/5	0/5	0/5	2/5	2/5	1/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5
29 giorni	A	1/5	4/5	0/5	0/5	2/5	2/5	1/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	3/5	0/5	1/5	1/5
	C	3/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	3/5	2/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5
	B	1/5	2/5	2/5	0/5	1/5	2/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	1/5	4/5	0/5
35 giorni	A	3/5	1/5	1/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	3/5	0/5
	C	2/5	2/5	1/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	4/5	0/5	1/5	0/5	4/5	1/5	0/5
	B	2/5	2/5	1/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5	1/5

		Organo															
		Laringe				Trachea				Sacchi aerei				Polmone			
Età degli animali	Gruppo	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
18 giorni	A	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
	C	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
	B	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
20 giorni	A	3/5	0/5	1/5	1/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5
	C	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
	B	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	3/5	1/5	0/5	1/5	2/5	0/5	3/5	0/5
22 giorni	A	1/5	1/5	3/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	2/5	3/5	0/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5
	C	1/5	1/5	3/5	0/5	0/5	2/5	3/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	1/5	4/5	0/5
	B	1/5	3/5	1/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
25 giorni	A	0/5	3/5	2/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	1/5	4/5	0/5	0/5	2/5	3/5	0/5	0/5
	C	2/5	1/5	2/5	0/5	1/5	2/5	2/5	0/5	1/5	2/5	2/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5
	B	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5
29 giorni	A	0/5	4/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
	C	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
	B	0/5	3/5	2/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5
35 giorni	A	1/5	4/5	0/5	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5	3/5	1/5	5/5	0/5	0/5	0/5
	C	1/5	1/5	3/5	0/5	1/5	1/5	3/5	0/5	0/5	1/5	0/5	3/5	1/5	3/5	1/5	0/5
	B	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	1/5	3/5	0/5	0/5	1/5	3/5	1/5	2/5	3/5	0/5	0/5

Appendice 3. Numero di soggetti positivi in *real-time* RT-PCR aMPV e *real-time* PCR MS dai diversi organi. Il momento del campionamento è espresso come età degli animali, l'infezione con aMPV è avvenuta a 15 giorni di vita, a 18 quella con MS (n.e.=analisi non eseguita).

		Momento del prelievo (età degli animali)												
Gruppo	Organo	Giorno 18			Giorno 20		Giorno 22		Giorno 25		Giorno 29		Giorno 35	
		aMPV	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS	aMPV	MS
A (aMPV)	Turbinati nasali	5/5	5/5	n.e.	4/5	n.e.	1/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.
	Trachea	4/5	5/5	n.e.	5/5	n.e.	1/5	n.e.	0/5	n.e.	2/5	n.e.	2/5	n.e.
	Congiuntiva	5/5	5/5	n.e.	3/5	n.e.	1/5	n.e.	1/5	n.e.	1/5	n.e.	0/5	n.e.
	Sacco aereo	1/5	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.
	Polmone	0/5	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	1/5	n.e.
	Milza	1/5	2/5	n.e.	0/5	n.e.								
	Rene	1/5	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.
	Tonsille cecali	0/5	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.
	Cloaca	0/5	3/5	n.e.	0/5	n.e.								
Cervello	0/5	1/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	
B (aMPV + MS)	Turbinati nasali	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	1/5	5/5	3/5	5/5	3/5	5/5
	Trachea	2/5	5/5	5/5	4/5	3/5	2/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5
	Congiuntiva	3/5	5/5	5/5	3/5	5/5	1/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	5/5
	Sacco aereo	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	0/5	4/5	0/5	0/5
	Polmone	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	4/5	0/5	3/5	0/5	3/5	0/5	3/5
	Milza	0/5	2/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5
	Rene	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	5/5	0/5	4/5
Tonsille cecali	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	

	Cloaca	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5	0/5	0/5
	Cervello	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	3/5	0/5	1/5
C (MS)	Turbinati nasali	n.e.	n.e.	5/5	n.e.	0/5	n.e.	5/5	n.e.	5/5	n.e.	5/5
	Trachea	n.e.	n.e.	5/5	n.e.	0/5	n.e.	5/5	n.e.	5/5	n.e.	5/5
	Congiuntiva	n.e.	n.e.	5/5								
	Sacco aereo	n.e.	n.e.	0/5	n.e.	1/5	n.e.	1/5	n.e.	2/5	n.e.	3/5
	Polmone	n.e.	n.e.	2/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	3/5	n.e.	2/5
	Milza	n.e.	n.e.	1/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	3/5
	Rene	n.e.	n.e.	0/5	n.e.	1/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5
	Tonsille cecali	n.e.	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	1/5	n.e.	0/5
	Cloaca	n.e.	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	0/5	n.e.	3/5	n.e.	0/5
	Cervello	n.e.	n.e.	0/5	n.e.	2/5	n.e.	0/5	n.e.	2/5	n.e.	0/5

2.7 BIBLIOGRAFIA

1. 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, 65-74.
2. Catelli E., Cook J.K.A., Chesher J., Orbell S.J., Woods M.A., Baxendale W., Huggins M.B. 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.
3. 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. Cook J.K.A. 2000. Avian Pneumovirus infection of turkeys and chickens. *The Veterinary Journal*, 160, 118-125.
4. Cook J.K.A., Cavanagh D. 2010. Detection and differentiation of avian (metapneumovirus). *Avian Pathology*, 31, 117-132.
5. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 in materia di “Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici”.
6. Feberwee A., Landman W.J.M. 2012a. *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* control and eradication in Dutch commercial poultry. In: Book of Abstract of the

- 20th International Congress of the International Organization for Mycoplasma IOM. pp. 33.
7. Feberwee A., Landman W.J.M. 2012b. The successful implementation of *Mycoplasma gallisepticum* monitoring and control programs in dutch commercial poultry: a declining seroincidence during an eleven year period. In: Book of Abstract of the 20th International Congress of the International Organization for Mycoplasma IOM. pp. 153.
 8. Ferguson-Noel N. and Noormohammadi A.H. 2013. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Swayne D.E. Disease of poultry. Pag. 900-910. 13th Ed. Wiley-blackwell.
 9. Ganapathy K., Jones R.C., Bradbury J.M. 1998. Pathogenicity of in vivo-passaged *Mycoplasma imitans* in turkey poults in single infection and in dual infection with rhinotracheitis virus. *Avian Pathology*, 27, 80-89.
 10. Garaibeh S.M., Algharaibeh G.R. 2007. Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan. *Poultry Science*, 86: 1677-1681.
 11. Garaibeh S., Shamoun M. 2012. Avian Metapneumovirus subtype B experimental infection and tissue distribution in chickens, sparrows and pigeons. *Veterinary Pathology*, 49: 704-709.
 12. Glisson J.R. 1998. Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Science*, 77, 1139-1142.
 13. 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.
 14. 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 turkeys. *Avian Diseases*, 48, 34-49.

15. Jones R.C. and Rautenschlein S. 2013. Avian Metapneumovirus. In: Swayne D.E. Disease of poultry. Pag. 112-125. 13th Ed. Wiley-blackwell.
16. Khehra 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.
17. Kleven S.H. 1998. Mycoplasmas in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry Science*, 77, 1146-1149.
18. Landman W.J.M. and Feberwee A. 2004. Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathology*, 33, 591-598.
19. Ley D.H. 2008. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *Disease of Poultry* 12th Ed., 805-834.
20. Majo N., Allan G.M., O'Loan C.J., Pagès A., Ramis A.J. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. *Avian diseases*, 39: 887-896.
21. Marien M. 2007. Mixed respiratory infections in turkeys, with emphasis on avian Metapneumovirus, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Escherichia coli* and *Mycoplasma gallisepticum*. Thesis for the degree of Doctor in Veterinary Science (Ph.D.), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.
22. Nakamura K., Mase M., Tanimura N., Yamaguchi S., Yuasa N. 1998. Attempts to reproduce swollen head syndrome in specific pathogen-free chickens by inoculating with *Escherichia coli* and/or turkey rhinotracheitis virus. *Avian Pathology*, 27:21-27.
23. Naylor C.J., Al-Ankari A.R., Al-Afaleq A.I., Bradbury J.M. 1999. Dual infection of turkey poults with avian pneumovirus and *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathology*, 28, 401-404.

24. Perreul G., Herin J.-B., Lemiere S., Delvecchio A., Mieli L., Sionneau O., Gautier X., Loyau M., Turblin V., Pagot E. 2017. Impact of field viral circulation on turkey performances in France. In: Momentum Scientific reports for animal health professionals, WVPA Congress, 4-8 settembre, Edinburgo.
25. Tucciarone C.M., Franzo G., Lupini C., Alejo C.T., Listorti V., Mescolini G., Brandão P.E., Martini M., Catelli E., Cecchinato M. 2017. Avian metapneumovirus in broilers in Italy. Poultry Science, In corso di pubblicazione.
26. Van Empel P.C.M. & Hafez H.M. 1999. Ornithobacterium rhinotracheale: a review. Avian pathology, 28, 217-22.

PARTE B

Application of different laboratory techniques to monitor the behaviour of
a *Mycoplasma synoviae* vaccine (MS-H) in broiler breeders

Articolo scientifico inviato alla rivista BMC Veterinary Research

(in corso di revisione)

Application of different laboratory techniques to monitor the behaviour of a *Mycoplasma synoviae* vaccine (MS-H) in broiler breeders

Author: Moronato M. L.^{1,2,*}, Cecchinato M.¹, Facchetti G.³, Mainenti M.⁴, Gobbo F.², Catania S.²

¹Università degli Studi di Padova, MAPS – Department of Animal Medicine, Production and Health. Viale dell'Università, 16, 35020. Legnaro, (Padova), Italy.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Avian Medicine Laboratory, Mycoplasma Unit - SCT1. Viale dell'Università, 10, 35020. Legnaro (Padova), Italy.

³Veterinary practitioner. Avicola Alimentare Monteverde SRL. Via San Donato, 107, 25038. Rovato (Brescia), Italy.

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Verona, SCT1. Via S. Giacomo 5, 37135, Verona. Italy.

Mattia Cecchinato mattia.cecchinato@unipd.it; Giuseppe Facchetti giuseppe.facchetti@tiscali.it;

Marta Mainenti martamainenti@gmail.com; Federica Gobbo fgobbo@izsvenezie.it; Salvatore

Catania scatania@izsvenezie.it

*Corresponding author: mmoronato@izsvenezie.it

Maria Luisa Moronato

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Avian Medicine Laboratory, Mycoplasma Unit - SCT1. Viale dell'Università, 10, 35020. Legnaro (Padova), Italy. Telephone number: +39 0498084288.

ABSTRACT

Background

Mycoplasma synoviae (MS) is a major poultry pathogen which causes severe economic losses in all the productive sectors. The prevalence of MS in European countries has increased in the last few years, leading to greater attention to the available methods to prevent its spread. The main strategy currently applied for its containment is the development and maintenance of MS-free breeder flocks. A live MS vaccine (MS-H) obtained by mutagenizing an Australian field strain has recently been introduced in Italy. The aim of the present study was to evaluate the vaccine behaviour in broiler breeder groups at different production stages and the effectiveness of the available laboratory tests in discriminating the MS-H from a field strain.

Results

The vaccine diffused extensively through the population, shown by the wide serological response (over 80% of positive samples in RSA and 85% in ELISA), the high serological titres, the positivity of all the tracheal samples collected during the production phase by MS PCR and the positivity by cultivation from tracheal swabs at the end-point (55 weeks after vaccination). In contrast, only one swab from a sternal *bursa* was positive in MS PCR, while all the joint and oviduct samples were negative. There was no evidence of vertical transmission. Different genotyping techniques were used to achieve a clear classification of the MS positive samples. The *vlhA* and the *obg* gene analysis showed that most of the strains were homologous with the vaccine, but some ambiguous samples were further investigated with the multi locus sequence typing (MLST) scheme which confirmed the homology.

Conclusions

The development of a multi-technique approach to monitor vaccinated avian flocks, based both on serological and biomolecular methods, is advised as well as the use of effective genotyping techniques to analyse the MS strains circulating in high densely populated poultry areas.

KEY WORDS

Mycoplasma synoviae, MS-H, chicken breeder, monitoring, genotyping.

BACKGROUND

Mycoplasma synoviae is a major pathogen responsible for economic losses in the poultry industry [1]. Although most of the time the infection occurs as a subclinical respiratory disease [1], MS can spread systemically to the joints and tendons in meat turkeys and broilers; recently it has also been associated with eggshell apex abnormalities (EAA) in laying hens [2; 3]. In mixed infections with Newcastle disease and infectious bronchitis, MS can be found in the lower parts of the respiratory system [1].

MS infection can occur as a result of either horizontal or vertical transmission and its worldwide prevalence appears to be increasing [4], including Italy [5]. MS infection often leads to severe economic losses due to reduced body weight, poor feed conversion rate, high carcasses condemnation and increased antibiotic treatment; moreover in case of EAA it can involve increased egg fragility, drop in egg production and reduction of the average egg weight [3].

The most effective control strategies are focused on the development and maintenance of MS-free breeder flocks, but in case of infection the interruption of the vertical transmission represents an important goal for the practitioner. In order to contain or to arrest the vertical diffusion of MS several methods are available. Firstly, where MS prevalence is low, the culling of breeder flocks is considered the most effective approach [6], but it is rarely applied because of the high cost. However, the production of a MS-positive offspring could have even worst economic consequences than those arising from the culling of breeder groups.

Two more methods may be applied in order to reduce MS vertical transmission: the vaccination of breeders [7] or the application of a targeted pulsatile treatment [Catania, personal communication]. These approaches represent useful tools for the producers to contain the risk of MS spread to the offspring and consequently to lower its prevalence in a geographical area.

Recently, a live vaccine (MS-H) developed in Australia (Vaxsafe MSH; Bioproperties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia) has been licensed in Italy. The MS-H vaccine is a temperature-

sensitive variant obtained by mutagenizing an Australian field isolate with N-methyl-N9-nitro-N-nitrosoguanidina [8]. The MS-H safety and the temperature sensitivity of the strain have been previously investigated [9].

The availability of the vaccine in Italy and the producers' need to better understand its behaviour in breeder flocks, as no previous report was available in this poultry sector, led to the development of a monitoring program of a vaccinated breeder group using samples collected for routine diagnostic purposes.

The aim of the present study is to evaluate the efficacy of the MS-H vaccine under field conditions in: a chicken breeder group measuring immunity, survival time and tissue localization; embryos looking at just survival times; and 1 day-old-chicks for immunity through different laboratory tools including serology, mycoplasma cultivation and PCR. In addition, several biomolecular techniques were applied to classify the MS positive samples and to confirm that the vaccine was the only strain circulating.

The development of a multi-technique scheme to recognize the vaccine from the field strains circulating could be useful for *Mycoplasma* monitoring in breeders and especially in high densely populated poultry areas (HDPPAs).

METHODS

Site description and history

A broiler chicken breeder farm, with high biosecurity measures, in a HDPPA in Italy was the object of the present study. The farm had been monitored for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* for several years before the study started and was shown to be MG-free, whereas there had been periodic outbreaks of MS.

The samples (sera, tracheal swabs and carcasses) were sent to the Avian Medicine Laboratory of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro – Padova, Italy) for diagnostic and monitoring purposes and, in agreement with the farmer, were used for further investigations of MS.

Breeders and MS-H vaccine

One-day-old chicks were bought as MG- and MS-free. They were allocated on a separate farm and organized in 4 barns: 3 female barns (2 barns with chicks of Ross genetic line and 1 barn with chicks of Cobb genetic line) and 1 male barn in 2-floor pens with mixed genetics, until transfer to the production site, which took place at 23rd week of age.

Before MS-H vaccination, birds were monitored serologically and by PCR to exclude the presence of MS infection. 30 MS ELISA (Idexx® USA), 30 rapid serum agglutination (RSA) tests (IDVET, Montpellier) [6] and 30 MS PCRs [10] on tracheal swabs were performed on randomly selected birds in each barn. At 4 weeks of age all the birds were vaccinated for *Mycoplasma synoviae* with MS-H vaccine (Vaxsafe MSH; Bioproerties Ltd., Ringwood, Victoria, Australia) following the manufacturer's instructions.

Ten weeks after the MS-H vaccination (14 weeks of age), 10 randomly selected birds in each barn were monitored serologically and by PCR comprising 10 MS ELISA, 10 MS RSA and 10 tracheal swabs for MS PCR.

The production farm (used from weeks 23 to 59) consisted of 6 barns of broiler breeders: in barn 1 and 2 were housed birds of Cobb genetic, whereas barns 3, 4, 5 and 6 held 308 Ross chicks. The organization of the animal housing and the protocols applied are shown in the Supplementary Material.

Recovery, viability and tissue distribution of MS-H vaccine in breeders

At the 23rd week of age, animals were moved to the production farm and divided in 6 groups as previously described.

Animals of each barn were monitored at fixed times: 25, 30, 38, 44, 49, 54 and 59 weeks of age. At every time interval, 10 tracheal swabs were sent to the IZSVE for specific MS PCR [10].

At 59 weeks of age, the production period was considered finished and the animals were sent to the abattoir. Ten carcasses from each barn were sent to the IZSVE for complete *post mortem* examination, particularly directed to the detection of MS. For each barn, 10 tracheal and 10 oviduct

swabs were collected during necropsy for specific MS PCR and cultivation. Additional samples were collected when gross pathological lesions characteristic of MS were found in target organs (i.e. air sacs, tibio-tarsal joints, sternal bursa). Consequently, 3 abnormal sternal bursa and 10 joints were tested either by PCR or *Mycoplasma spp.* cultivation.

DNA was extracted from the collected specimens using QIAmp[®] DNA mini kit (Qiagen[®]) and tested by a specific MS PCR [10].

Furthermore, swabs were submitted for *Mycoplasma spp.* isolation in Mycoplasma Experience (ME) broth medium (Reigate, UK) following the internal laboratory procedure and incubated at 37°C under CO₂ conditions for at least 15 days. Briefly, during this time the cultures were checked daily and when a change in colour or turbidity was seen, the broth was inoculated onto an agar plate (ME, Reigate, UK) to evidence the presence of typical egg-fried colonies [11]. The inoculated agar plates were checked for 15 days and considered negative if no sign of growth was seen after this period of time [11]. DNA was extracted from broths of suspect samples using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche[®]) and *Mycoplasma* species identification was performed with the 16S-rDNA-PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) [12].

Assessment of vertical transmission of MS-H vaccine

At 30, 44, 49, 54, 59 weeks of age, 30 embryonated eggs were tested for MS by isolation and specific MS PCR. The specimens collected were swabs of the internal surface of the yolk sac and the trachea, which were analysed in pool of 10 samples for *Mycoplasma spp.* cultivation and specific MS PCR, as previously described.

Genotyping of MS positive samples in breeders

As the present study was carried out in a commercial farm, two main genotyping methods were applied to all the MS positive samples to confirm that the vaccine was the only strain circulating. These samples were analysed in the variable lipoprotein hemagglutinin A (*vlhA*) gene [13; 14] and the *spOB*-associated GTP binding globulin gene (*obg*) [15; 16] were analysed, although they are

reported as not always useful for MS differentiation [17; 18; 19]. When the *vlhA* and *obg* gene analysis led to ambiguous results, samples were further investigated by multi locus sequence typing scheme (MLST) of 5 specific housekeeping genes [20]. The oligonucleotide primers used in this study and the amplification product size are reported in Table 1. The positive PCR products were purified and sequenced in both directions. The sequences were cleaned-up and analysed using Molecular Evolutionary Genetics Analysis6 (MEGA6) software.

Table 1. Gene targets and primer details

Gene target	Primer forward	Primer reverse	PCR amplicon size (bp)
<i>vlhA</i>	5'-ATT AGC AGC TAG TGC AGT GGC C-3'	5'-AGT AAC CGA TCC GCT TAA TGC-3'	315-372
<i>obg</i>	5'-GTT GAT AAA GGT GGA CCA G -3'	5'-TTA GTG CAG ATA TCT CAA TG-3'	841
<i>nanA</i>	5'- TTGAAAAACAAAAAGTTGA TGGAA-3'	5'-ATGATTGCATTAGCGCCTTT- 3'	544-559
<i>ugpA</i>	5'- TTAGATTTGCAATCGGTTTT AGA-3'	5'-CCGCGTCAGTTGGACTATTT- 3'	537
<i>ruvB</i>	5'- GAATGCCTGGAATGGGTAA A-3'	5'-TGTC AATGATTCCAGCGTTT- 3'	546
<i>lepA</i>	5'- AGCGCCGATGTTGAYAGAG T-3'	5'-GAGTGCTTCTTTGGCTGGAT- 3'	462
<i>uvrA</i>	5'- CKGCAAACATGGTTTCTTC G-3'	5'- TGGGTTCTTTTACATGCGGTA- 3'	468

MS immunity in breeders and offspring

At fixed times (25, 30, 38, 44, 49, 54 and 59 weeks of age) 20 blood samples from each barn were collected and analysed at the IZSVe for specific MS serology. Blood samples were tested for MS ELISA and Rapid Serum Agglutination (RSA) as above. Concerning the MS ELISA, positive titres were classified as A: positive titre of <4.000 OD (low positive), B: positive titre <10.000 OD (high positive) and C positive titre >10.000 OD (very high positive). Since the monitoring programs are not commonly applied to 1-day-old chicks, a small number of serum samples (160) were randomly collected from several barns and tested in MS ELISA. The time of collection was 41, 46 and 51 weeks of age of the breeders.

RESULTS

Breeders and MS-H vaccine

The samples collected in each barn 10 weeks after vaccination were positive for MS in ELISA, RSA and PCR, confirming the correct application of the vaccination procedure.

Recovery, viability and tissue distribution of MS-H vaccine in breeders

All the tracheal samples collected in each barn during the production phase were positive for MS by PCR (36 tracheal swabs).

Post mortem examination of the 10 carcasses per barn did not show gross pathological lesions of MS. Nevertheless, pathological findings were reported from the sternal *bursa* of birds in barn 1, 5, 2 and 6. The lesions ranged from mild inflammatory signs to well-organized exudate. Moreover, at least one bird in each barn showed swollen joints (tibio-tarsal and/or interphalangeal joints), which were associated with increased synovial fluid or sero-catharral exudate. Consequently, 3 sternal bursa swabs (barn 1, 2 and 5) and 11 joint swabs were collected for specific MS PCR and for *Mycoplasma* cultivation.

All the tracheal swabs collected during *post mortem* examinations were positive by MS PCR. Mycoplasma cultivation from tracheal swabs was also positive, showing typical egg-fried colonies on solid medium. The 16S-rDNA-PCR-DGGE identified the positive samples as *Mycoplasma synoviae*. Oviduct swabs were negative by both PCR and cultivation. The specimens collected from the joints were also negative both in PCR and in cultivation, while the sternal *bursa* swab of a bird in barn 2 was positive by MS PCR.

Assessment of vertical transmission of MS-H vaccine

A total of 150 embryonated eggs, collected at 30, 44, 49, 54 and 59 weeks, which correspond to the laying week 27, 41, 49, 51, 57, were negative for MS by isolation and PCR.

Genotyping of MS positive samples in breeders

The 55 MS positive samples, resulting from MS PCR and *Mycoplasma* cultivation, were further investigated by molecular typing of their *vlhA* gene. Based on the *vlhA* analysis most of the samples were identical to the MS-H vaccine, as they were classified as type C, subtype 3 and group 13. However, one tracheal sample from barn 1 and one from barn 4 were classified as type E, group 11 (Table 2).

Moreover, the *spOB*-associated GTP binding gene (*obg*) of all the positive samples were sequenced and analysed in three nucleotide positions (pos. 178, 367 and 629). Briefly, the analysis of the point mutation in position 629 (C>T) reveal the transition from a C in the MS-H ts+ strain to a T in a re-isolated ts- strain, which was detected for the first time at week 25 in barn 4. Moreover, reisolated ts- strains were detected in barn 1, 4, 5 and 6 at 59 weeks.

Based on the analysis of the *obg* gene in position 367 (A>G), 4 samples (at week 25 in barn 1, then at week 36 in barn 6, at week 50 in barn 6 and finally at week 59 in barn 3) were not classified as MS-H vaccine or its reisolates, but as parental strain ts-. The *vlhA* gene of these 4 samples was previously defined as type C3, group 13 (Table 2).

In order to detect the presence of wild strains, 6 samples not clearly classified by previous methods were further investigated by MLST. Their MLST allelic profile was identical to the MS-H vaccine, confirming that there was no other MS strain circulating during the field study (Table 2).

MS immunity in breeders and offspring

Just over 80% (666 of 840) of all tested samples were positive by the RSA. However, there were differences in the percentage of positive samples over time: week 25 (38%), 30 (80%), 38 (100%), 44 (62%), 49 (75%), 54 (100%) and 60 (100%). The ELISA results showed an evident seroconversion in the all tested samples (717 positive sample out of 840 - 85%), with modifications during the time week 25 (75%), 30 (100%), 38 (100%), 44 (83%), 49 (83%), 54 (83%) and 60 (85%) and between flocks (Table 3). The positive titres showed a wide range of distribution: most of the samples (65%) were classified as class A (positive), whereas the percentage of class B (high positive) was 32% and only 3% were included in the C class (very high positive). Four barns (2, 4, 5, and 6) showed very high positive titres and only barn 6 reached the 65% of positivity (C class). The mean titres are reported in table 3.

About the 57% of sera from 1-day-old chicks was positive at the 3 sampling times (Table 4); all the positive samples showed titres below 4.000 (positive).

Table 4. Results of 1-day-old chicken *sera* tested in MS ELISA, expressed as number of positive and negative samples and in percentage between brackets.

Week of layed eggs	Samples number		
	Negative	Positive	Total
41	38 (63%)	22 (37%)	60
46	30 (75%)	10 (25%)	40
51	- (0%)	60 (100%)	60
Total	68 (43%)	92 (57%)	160

DISCUSSION

The increasing prevalence of MS in many countries shows that this pathogen represents a persistent challenge for the poultry industry. The vertical transmission of MS can be considered a critical point to control its spread to the offspring. The control programs previously applied to the poultry industry have enabled the eradication of important *Mycoplasma* species, such as MG where a high reduction of prevalence has been achieved at least in the European countries, while sporadic outbreaks of *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma iowae* are occasionally reported in backyard flocks [11] and industrial turkeys respectively [21; 22]. The eradication measures commonly applied for *Mycoplasma* species seem to have been ineffective for MS which could be related to the lower attention paid up to now to this bacterial species. The implementation of biosecurity measures, the targeted pulsatile treatment of breeders or the preventive vaccination could be applied to reduce the spread of MS-positive offspring, without resorting to the cull of breeders.

The aim of this study was to analyse the MS vaccine behaviour (MS-H) in a broiler breeder farm with a high biosecurity level. In particular, it was directed to evaluate the laboratory tests available to screen the animals and to define correctly the sanitary status of breeder groups, which could also be useful for the authorization in intra-community exchanges of embryonated eggs or 1-day-old chicks (2009/158/CE).

The thermo-susceptible MS-H strain showed a wide diffusion in the breeder group confirmed by the positivity in PCR during the whole production period, in addition the wide spread of the strain, is confirmed by the serological data reported in this study, in which most of the tested population showed a strong seroconversion. It is interesting to highlight that while the MG vaccine (TS-11[®]) is produced with a similar technology to the MS-H, its serological behaviour looks different. Flocks vaccinated with TS-11[®] have a lower seroconversion rate of around 60% of birds as well as lower mean titres as compared to MS-H vaccinated flocks. As reported by Barbour et al. (2000) [23], the ELISA OD rate at the peak (23 weeks after vaccination with ts-11) was 46.6% in flock 1 and the TS-11[®] is not commonly recovered after the 30th week after vaccination. Actually, in the present study, the serum samples of birds in many barns (3, 4, 5, and 6) showed a 100% positivity for MS in ELISA at different sampling times and the rate of positivity was particularly high in the last 30 weeks of production, while the MS-H vaccine was administered at 4 weeks of age. The positive titres were very high demonstrating a strong immune reaction against the vaccine.

This strong serological behaviour could be explained by the high MS-H persistence in the population and by its possible recirculation in the host, which provides a persistent immunogenic stimulus. This high seroconversion in breeders is then transferred to 1-day-old chicks, as MS antibodies were clearly detected in the offspring; but these findings should be confirmed by further studies on a larger number of samples. These preliminary results could represent a disadvantage in for the trade in 1-day-old chicks, until a DIVA serological test is developed.

In addition, the vaccine strain was also highly persistent during the period of the study as it was still being isolated from the trachea of birds at the end of the cycle (55 week after vaccination). This

strain seems to be able to recirculate inside the population and to maintain itself in the flock. This behaviour is similar to that expressed by wild strains, which are associated with positivity by PCR during the entire life of the breeders. It is evident that the PCR screening of tracheal swabs is not enough to discriminate a vaccinated group from an infected one and more discriminatory tests are required.

The long term persistence of the vaccine is confirmed by the isolation of MS from tracheal samples at the end of the cycle. The isolation of mycoplasma by cultural method demonstrates the viability of the strain and its presence in high quantity. The vaccine was isolated at the end of the cycle from the upper respiratory tract and it is important to highlight that there was no evidence of MS in other target sites, such as oviduct and joint. Only one swab taken from an abnormal sternal *bursa* was positive in the MS PCR, although it was negative by culture. This apparent discrepancy could be explained by the better sensitivity of the PCR. The detection of MS DNA in the sternal bursa of one bird was probably due to its spread within the body, but based on the results reported in this trial, its dissemination seems to be a very rare phenomenon.

As only tracheal samples were positive by cultivation, the vaccine strain, unlike the wild types, seemed unable to colonize different tissues other than the upper respiratory tract.

These results confirm, as reported for the ts-11 vaccine [24], that the MS-H seemed incapable of spreading and colonizing the oviduct, which was also shown by the negative results of the oviducts and, therefore, of the embryonated eggs. The laboratory findings of the present study suggest that there was no vertical spread of the MS vaccine, but further large scale studies should be carried out in view of the recent reports of MG vaccine transmission in the USA [25].

The *vlhA* gene sequencing was applied as it is a helpful tool to classify different isolates and in some specific cases or geographic area it could also be used to discriminate the vaccine from wild strains [18]. Recently, the *vlhA* technique was not always found to be able to discriminate the vaccine in Italy [17], as a wild strain isolated in this geographical area showed complete homology to the MS-H in the *vlhA* gene sequence. An additional biomolecular test, based on the *obg* gene

analysis [26; 17] was introduced to classify all the positive samples as MS-H strain, MS-H reisolates (ts+ and ts-) or parental strains ts-.

The analysis of the *obg* gene sequence defined most of the samples as MS-H, but it is important to highlight that some samples were classified as re-isolates ts-, confirming the possible lack of thermosusceptibility as previously reported by Noormohammadi et al. (2003) [27]. In the present study the single point mutation associated with the lack of thermosusceptibility was detected as early as week *post* vaccination (p.v.). 21 in barn 4 and then at 55 weeks p.v. in barn 1, 4, 5 and 6. It is interesting to report that the mutation in position 629 was not confirmed in each barn at every sampling time; for example in barn 4 the point mutation was not recovered until the end of the trial. These results suggest that the 2 vaccine types (MS-H ts+ and reisolate ts-) could be present together in the population. It is important to report that from the 25th week (21 weeks after vaccination), at many sampling times, at least one ts- reisolate was detected in the six barns. Four MS positive samples, defined as type C3 group 13 for the *vlhA* gene, were classified as parental strain ts- based on the *obg* gene analysis.

Moreover, the analysis of 5 housekeeping genes basing on the MLST scheme [20] was applied in order to exclude an improper classification and the presence of any other strain circulating. The results confirmed the complete homology of all the samples, including the ambiguous ones, to the MS-H vaccine in all the 5 genes.

Based on the *vlhA* genotyping techniques [13; 14], all the strains were classified as type C, subtype 3 and group 13, which is the same genotype as the vaccine, with the exception of 2 samples (barn 1 and 3), which showed a different *vlhA* sequence classified as type E and group 11.

These data highlight the possible rearrangement of the *vlhA* gene, which is considered a common feature of *Mycoplasma* species [28; 27]. They also show that the MS-H vaccine was maintained in the avian group as a main population with the same *vlhA* sequence (type C3, group 13) and a minor population with a different *vlhA* type (type E, group 11). Moreover, it is important to emphasise that

this mutated population was detected only in 2 samples by isolation and PCR, suggesting that they were unable to spread efficiently inside the population.

The different *vlhA* type (type E, group 11) is the same previously reported by Bayatzdeh et al. (2014) [19] in a similar field trial. While few reports exist, studies have shown a change of the *vlhA* sequence in vaccinated birds and in both cases the same kind of genetic change was seen; thus it is possible to speculate that MS possesses a specific and organized ability to rearrange genetic segments the *vlhA* gene [27]. Of course further studies are necessary to substantiate this hypothesis.

CONCLUSIONS

The MS-H vaccine showed a wide diffusion and a great persistence in the groups, evidenced by a clear and high seroconversion of the vaccinated chickens and their progeny comparable to the behaviour of the wild strain. The *vlhA* method alone seems not always effective in discriminating the vaccine from wild strains, as recently reported by Catania et al. (2016) [17]; in fact two samples were classified as type E – group 11, instead of type C3 - group 13. In a similar way, the *obg* gene analysis was not always successful in the definition of the vaccine or wild strain, as the four samples classified as parental strains- showed complete homology to the MS-H vaccine ST, basing on the MLST scheme.

Moreover, no clinical or pathological signs characteristics of MS infection were found during the whole production cycle. Consequently, based on these results, the use of the *obg* gene for the MS-H vaccine seems insufficiently discriminatory and up to now the application of different biomolecular techniques together could represent an effective laboratory system to monitor vaccinated populations.

The development and validation of biomolecular and serological DIVA methods, as well as genotyping studies on the MS population in HDPPAs, are strongly desirable to improve monitoring laboratory activities on avian flocks.

DECLARATIONS

Ethics approval and consent to participate

The samples were sent to the Avian Medicine Laboratory of the Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro – Padova, Italy) for diagnostic and monitoring purposes and, in agreement with the farmer, were used for the further investigations of MS reported in the present study.

Consent for publication

Not applicable

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests

Funding

This work was supported by the Italian Ministry of Health with the Project RC IZSVE 15/10 “Le micoplasmosi nel settore avicolo industriale: studio e messa a punto di nuove metodiche e protocolli diagnostici al fine di valutare e studiare il differente ruolo dei ceppi circolanti tra le differenti tipologie di produzioni avicole”.

Authors' contributions

ML-M gave support during necroscopies and carried out biomolecular tests and sequencing analysis; M-C contributed in data analysis and in writing the manuscript; F-G carried out the necroscopies, the diagnosis and isolation of *Mycoplasma synoviae*; M-M contributed in data analysis and in writing the manuscript; G-F performed the activities in the field and reported the anamnestic information and the follow-up of the groups; S-C performed the study design, supervised the activities during necropsies and managed the additional tests performed. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Not applicable

REFERENCES

1. Kleven SH, Ferguson-Noel N. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V. Disease of poultry. Wiley-Blackwell; 2013. p. 900-906.
2. Feberwee A, de Wit JJ, Landman WJ. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathol.* 2009; 38:77-85.
3. Catania S, Bilato D, Gobbo F, Granato A, Terregino C, Iob L, Nicholas RA. Treatment of eggshell abnormalities and reduced egg production caused by *Mycoplasma synoviae* infection. *Avian dis.* 2010; 54:961-4.
4. Landman WJ. Is *Mycoplasma synoviae* outrunning *Mycoplasma gallisepticum*? A viewpoint from the Netherlands. *Avian Pathol.* 2014; 43:2-8.
5. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Gagliazzo L, Moronato ML, Terregino C, Bradbury JM, Ramirez AS. Two strains of *Mycoplasma synoviae* from chicken flocks on the same layer

- farm differ in their ability to produce eggshell apex abnormality. *Vet Microbiol.* 2016;193:60–66.
6. Kleven SH. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. *Avian dis.* 2008; 42:367-374.
 7. Feberwee A, Morrow CJ, Ghorashi SA, Noormohammadi AH, Landman WJ. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities induced by a *M. synoviae* infection preceded by an infection with infectious bronchitis virus D1466. *Avian Pathol.* 2009;38:333-40.
 8. Morrow CJ, Markham JF, Whithear KG. Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. *Avian Dis.* 1998;42:667-70.
 9. Noormohammadi AH, Jones JF, Harrigan KE, Whithear KG. Evaluation of the Non-Temperature-Sensitive Field Clonal Isolates of the *Mycoplasma synoviae* Vaccine Strain MS-H. *Avian Dis.* 2003;47:355-360.
 10. Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, van Santen VL. Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. *Avian dis.* 1993;37:829-834.
 11. Catania S, Rodio S, Moronato ML, Ayling RD, Nicholas RAJ. Outbreak of disease associated with *Mycoplasma meleagridis* in a free-range mixed poultry farm. *Vet Rec Cas Rep.* 2014; doi:10.1136/vetreccr-2014-000107.
 12. McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J Med Microbiol.* 2005;54:731-739.
 13. Bencina D, Dobnic VM, Horvat S, Narat M, Kleven SH, Dovc P. Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* haemagglutinin. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001;203:115-123.

14. Hammond PP, Ramirez AS, Morrow CJ, Bradbury JM. Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemaagglutinin encoding gene *vIhA* and its value for strain typing. *Vet. Microbiol.* 2009;136:61-68.
15. Shahid M, Markham PF, Markham JF, Marena MS, Noormohammadi AH. Mutations in GTP binding protein *obg* of *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H: implications in temperature sensitivity phenotype. *PLoS One.* 2013; doi:10.1371/journal.pone.0073954
16. Shahid MA, Markham PF, Marena MS, Agnew-Crumpton R, Noormohammadi AH. High-resolution melting-curve analysis of *obg* gene to differentiate the temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* vaccine strain MS-H from non-temperature-sensitive strains. *PLoS One.* 2014; doi:10.1371/journal.pone.0092215.
17. Catania S, Gobbo F, Ramirez AS, Guadagnini D, Baldasso E, Moronato ML, Nicholas RAJ. Laboratory investigations into the origin of *Mycoplasma synoviae* isolated from a lesser flamingo (*Phoeniconaias minor*). *BMC Vet Res* 2016; doi:10.1186/s12917-016-0680-1.
18. Ogino S, Munakata Y, Ohashi S, Masato F, Sakamoto H, Sekiya Y, Noormohammadi AH, Morrow C. Genotyping of Japanese field isolates of *Mycoplasma synoviae* and rapid molecular differentiation from the MS-H vaccine strain. *Avian Dis.* 2011;55:187-194.
19. Bayatzadeh MA, Pourbakhsh SA, Ashtari A, Abtin AR, Abdoshas M. Molecular typing of Iranian field isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vaccine strain MS-H using *vIhA* gene. *Br. Poult. Sci.* 2014;55:148-56.
20. Dijkman R, Feberwee A, Landman JM. Development and evaluation of a multi-locus sequence typing scheme for *Mycoplasma synoviae*. *Avian Pathol.* 2016;45:426-442.
21. Catania S, Gobbo F, Bilato D, Fincato A, Battanelli G, Iob L. Isolation of *Mycoplasma iowae* in commercial turkey flocks. *Vet Rec.* 2012;170:107-108.
22. Ley DH, Marusak RA, Vivas EJ, Barnes HJ, Fletcher OJ. *Mycoplasma iowae* associated with chondrodystrophy in commercial turkeys. *Avian Pathol.* 2010;39:87-93.

23. Barbour EK, Hamadeh SK, Eid A. Infection and immunity in broiler chickens breeders vaccinated with temperature-sensitive mutant of *Mycoplasma gallisepticum* and impact on performance of offspring. *Poult. Sci.* 2000; 79:1730-1735.
24. Markham JF, Scott PC, Whithear KG. Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian dis.* 1998;42:682-689.
25. Ferguson-Noel NM, Williams SM. The efficacy of *Mycoplasma gallisepticum* K-strain live vaccine in broiler and layer chickens. *Avian Pathol.* 2015;44:75–80.
26. Kreizinger Z, Sulyok KM, Pásztor A, Erdélyi K, Felde O, Povazsán J, Kőrösi L, Gyuranecz M. Rapid, Simple and Cost-Effective Molecular Method to Differentiate the Temperature Sensitive (ts+) MS-H Vaccine Strain and Wild-Type *Mycoplasma synoviae* Isolates. *PLoS One.* 2015; doi:10.1371/journal.pone.0133554.
27. Noormohammadi AH, Markham PF, Kanci A, Whithear KG, Browning GF. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *mycoplasma synoviae*. *Mol Microbiol.* 2000;35:911-923.
28. Delaney NF, Balenger S, Bonneaud C, Marx CJ, Hill GE, Ferguson-Noel N, Tsai P, Rodrigo A, Edwards SV. Ultrafast Evolution and Loss of CRISPRs Following a Host Shift in a Novel Wildlife Pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. *PLoS Genet.* 2012; doi:[10.1371/journal.pgen.1002511](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002511).

1 Table 2. Genotyping results of MS strains

Sample ID and Genbank Accession Number	Weeks after vaccination	Barn	vlhA	obg	lepA	nanA	ruvB	ugpA	uvrA	MLST ST
IZSVE/2017/860	Vaccine	-	Type C3, group 13	MS-H	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991388	KY991394	KY991412	KY991418	KY991430	KY99144 2	KY99145 4	/
IZSVE/2013/2986- 1	21	1	Type C3, group 13	parental strain ts-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991382	KY991400	KY991406	KY991424	KY991436	KY99144 8	KY99146 0	/
IZSVE/2013/2986- 4	21	4	Type C3, group 13	reisolate ts-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991383	KY991401	KY991407	KY991425	KY991437	KY99144 9	KY99146 1	/
IZSVE/2013/4519- 6	32	6	Type C3, group 13	parental strain ts-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991384	KY991402	KY991408	KY991426	KY991438	KY99145 0	KY99146 2	/
IZSVE/2013/5404-	40	6	Type C3, group 13	MS-H	2	25	19	24	21	1

6	Genbank Accession Numbers		KY991385	KY991403	KY991409	KY991427	KY991439	KY991451	KY991463	/
IZSVE/2013/6965-6	50	6	Type C3, group 13	parental strains-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991386	KY991404	KY991410	KY991428	KY991440	KY991452	KY991464	/
IZSVE/2014/368-2	55	2	Type C3, group 13	MS-H	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991389	KY991395	KY991413	KY991419	KY991431	KY991443	KY991455	/
IZSVE/2014/368-6	55	6	Type C3, group 13	reisolate ts-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991390	KY991396	KY991414	KY991420	KY991432	KY991444	KY991456	/
IZSVE/2014/371-1	55	1	Type E, group 11	reisolate ts-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991387	KY991405	KY991411	KY991429	KY991441	KY991453	KY991465	/
IZSVE/2014/373-12	55	3	Type C3, group 13	parental strains-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991391	KY991397	KY991415	KY991421	KY991433	KY991445	KY991457	/
IZSVE/2014/374-	55	4	Type E, group 11	reisolate ts-	2	25	19	24	21	1

12	Genbank Accession Numbers		KY991393	KY991399	KY991417	KY991423	KY991435	KY99144 7	KY99145 9	/
IZSVE/2014/374- 11	55	4	Type C3, group 13	reisolate ts-	2	25	19	24	21	1
	Genbank Accession Numbers		KY991392	KY991398	KY991416	KY991422	KY991434	KY99144 6	KY99145 8	/

Table 3. ELISA serological titres of breeder flocks represented in Number of Positive Samples (NPS) and percentage (%), the mean titre is reported above.

	Weeks of age	25th week	30th week	38th week	44th week	49th week	54th week	59th week	
Barn									Total
1	NPS (%)	6 (30%)	20 (100%)	15 (75%)	16 (80%)	10 (50%)	10 (50%)	10 (50%)	87 (62%)
1	Mean titre	1653	5152	4430	2305	3599	4105	3577	4003
2	NPS (%)	18 (90%)	20 (100%)	10 (50%)	16 (80%)	10 (50%)	14 (70%)	16 (80%)	104 (74%)
2	Mean titre	1953	2886	2422	3948	2538	1783	2310	2633
3	NPS (%)	16 (80%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	18 (90%)	20 (100%)	134 (96%)
3	Mean titre	3938	4607	5853	2210	2837	2482	3271	3557
4	NPS (%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	18 (90%)	138 (99%)
4	Mean titre	3278	4616	3886	5236	2769	5314	2874	4105

5	NPS (%)	20 (20%)	20 (100%)	20 (100%)	12 (60%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100 %)	132 (94%)
5	Mean titre	2739	3365	3561	2348	3391	4633	5802	3733
6	NPS (%)	10 (50%)	20 (100%)	20 (100%)	16 (80%)	20 (100%)	18 (90%)	18 (90%)	122 (87%)
6	Mean titre	14583	4536	3668	2261	3327	6639	2473	4795
	Total	90 (75%)	120 (100%)	105 (100%)	100 (83%)	100 (83%)	100 (83%)	102 (85%)	717 (85%)
	Mean titre	4158	4193	4096	2849	3079	4291	3436	3753

4. CONCLUSIONI

Lo studio descritto nella parte A della presente tesi ha consentito di riprodurre sperimentalmente l'infezione da *Metapneumovirus* aviare nel pollo categoria *broiler* anche con sintomatologia respiratoria e con evidenza di “testa gonfia”. Il buon esito dell'infezione sperimentale in presenza di SHS potrebbe essere supportato dal ceppo virale utilizzato, isolato dalla medesima categoria, e dall'età degli animali, che potrebbero essere i fattori discriminanti escludendo la via di inoculo e la dose infettante che sono paragonabili agli altri studi sperimentali.

Inoltre, la via di infezione oculo-congiuntivale per MS si è dimostrata efficace nell'instaurarsi della malattia, confermando la possibilità di utilizzare tale via, meno invasiva rispetto alle vie convenzionali endo-tracheale ed endo-venosa, in studi di tipo sperimentale.

La valutazione complessiva dei dati sperimentali ha confermato nei gruppi infettati con singolo agente l'andamento atteso. Nel gruppo coinfecto si è evidenziato un possibile effetto sinergico/addittivo a carico dei turbinati nasali, supportato dai dati quantitativi delle PCR specifiche, dallo score delle lesioni macroscopiche e dalla sintomatologia scolo nasale e testa gonfia. Questi dati potrebbero suggerire il possibile ruolo anche di *Mycoplasma synoviae* nello sviluppo di SHS. Il medesimo effetto addittivo/sinergico non viene invece evidenziato a carico di altri organi respiratori e nemmeno a carico di quelli periferici, evidenziando una minore capacità di diffusione di aMPV in compresenza di *Mycoplasma synoviae*. Nonostante ciò il *Metapneumovirus* sembra aver svolto un ruolo di “apripista” a *Mycoplasma synoviae*, permettendone una maggiore diffusione sistemica in organi non considerati *target* sia in termini quantitativi che temporali.

Il presente studio ha rilevato inoltre una evidente sintomatologia clinica ed elevati score associati alle lesioni macroscopiche non solo a carico delle vie aeree superiori, ma anche dei distretti più

profondi. Tali evidenze sperimentali sono già di per se rilevanti e si deve sottolineare come in campo potrebbero essere ancor più aggravate da altri agenti batterici o virali con conseguente aumento della morbilità e mortalità. Risulterebbe quindi utile valutare il possibile impatto zootecnico dei due agenti in condizioni sperimentali per comprendere se in funzione del loro potenziale patogeno e della rilevanza epidemiologica possa essere utile un loro controllo, tramite profilassi indiretta, anche in una categoria a breve ciclo come quella del *broiler*.

La parte B della presente tesi riporta dati di campo volti alla valutazione della vaccinazione come metodo di controllo di *Mycoplasma synoviae* in polli riproduttori pesanti e delle metodiche di laboratorio attualmente disponibili per la corretta identificazione dello stato sanitario degli animali. Il vaccino utilizzato (MS-H) nella presente prova ha dimostrato un'ampia diffusione all'interno del gruppo di riproduttori, testimoniata non solo dai risultati delle PCR specifiche e delle analisi sierologiche, ma soprattutto dal re-isolamento di MS da tampone tracheale a fine ciclo (55 settimane *post-vaccinazione*). Questi dati suggeriscono come il ceppo vaccinale, in modo simile ad un ceppo di campo, sembri essere in grado di ricircolare e mantenersi a lungo all'interno della popolazione ospite. Al contrario il vaccino sembra tuttavia colonizzare selettivamente l'apparato respiratorio superiore. Infatti è opportuno segnalare come non sia stata riscontrata presenza di MS a livello oviduttale o articolare, né nelle uova scarto schiusa. L'esito positivo degli esami sierologici effettuati dagli animali di 1 giorno di vita ha confermato anche per MS-H il trasferimento di immunità passiva che, in assenza di specifici *test* DIVA, potrebbe comportare difficili interpretazioni dei risultati e tali positività potrebbero quindi avere implicazioni in ambito commerciale. Per raggiungere una corretta classificazione dei campioni MS positivi e una discriminazione del ceppo vaccinale, si è resa necessaria l'analisi di diversi geni, confermando la parziale utilità del gene *vlhA* almeno per quanto riguarda il territorio nazionale ed evidenziando che il gene *obg* non sembrerebbe essere particolarmente efficace; infine, alcuni campioni di difficile interpretazione hanno necessitato dell'analisi di ulteriori sequenze genomiche.

Quindi, con l'obiettivo di disporre di metodiche discriminative specifiche (DIVA test) l'utilizzo congiunto di differenti metodiche di laboratorio (sierologiche e biomolecolari) può attualmente rappresentare un approccio efficace per la corretta valutazione e classificazione dello *status* sanitario nei confronti di MS in gruppi di polli riproduttori vaccinati per questo patogeno.

