



# Il Virus della Malattia di Marek





**Isabel M. Gimeno**  
College of Veterinary Medicine  
North Carolina State University

La Dr.sa Isabel Gimeno si è laureata nel 1995, specializzata nel 1996 ed ha ottenuto il Dottorato di Ricerca nel 1999 presso l'Universidad Complutense di Madrid. E' diplomata all'American College of Poultry Veterinarians dal 2002. Ha fatto la ricerca post dottorato presso il Centro de Investigaciòn en Sanidad Animal (CISA), in Spagna e presso l'Avian Disease and Oncology Laboratory (ADOL) della USDA-ARS ad East Lansing , Michigan, US. Attualmente è Professore Associato nel College of Veterinary Medicine, North Carolina State University. Dal 1994 la sua principale attività di ricerca riguarda la Malattia di Marek, in particolare per gli aspetti che si riferiscono alla patogenesi, alla diagnosi ed al suo controllo. Ha revisionato e valutato 45 pubblicazioni e 5 capitoli di libri. E' stata invitata come relatrice a più di 40 convegni in diversi paesi ed ha al suo attivo oltre 60 pubblicazioni. Nella sua carriera professionale è a fianco dell'industria avicola per i problemi di diagnosi e prevenzione della Malattia di Marek.

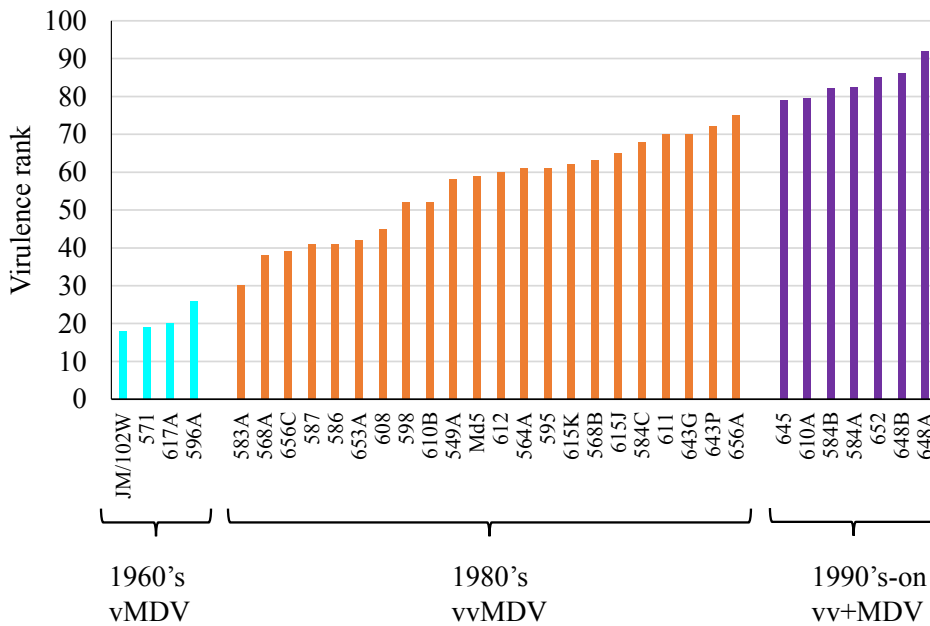
- La Malattia di Marek (MD) è un problema sempre presente nell'industria avicola in tutto il mondo per l'evoluzione continua dei virus di campo e la comparsa di ceppi sempre più patogeni.
- I nuovi ceppi comparsi del virus della Malattia di Marek (MDVs) sono in grado di superare l'immunità vaccinale e possono essere fortemente immunosoppressori.
- Per prevenire l'insorgenza delle neoplasie, è importante ritardare l'infezione degli animali con il virus di campo della MD, sia utilizzando idonee procedure di biosicurezza che migliorando la tecnica ed i protocolli della vaccinazione.
- L'esecuzione delle vaccinazioni è complessa, richiede esperienza ed un attento controllo, poiché il vaccino contro la MD è associato a cellule. Le verifiche possono essere fatte ispezionando periodicamente in incubatoio le modalità di stoccaggio e di preparazione del vaccino, verificando i titoli dei lotti in laboratori specializzati e controllando la replicazione del virus vaccinale nei follicoli delle penne ad una settimana di età.
- La diagnosi, in caso si verificano episodi di MD, deve essere fatta a diversi livelli. In azienda con la raccolta di dati epidemiologici, clinici e patologici, poi completata in laboratorio, dove possono essere utilizzate diverse tecniche per confermarla. Tra queste, le più utili sono l'Istopatologia, la RT PCR e l'immunoistochimica.
- Al processo diagnostico deve essere affiancata l'identificazione delle cause del problema. Gli aspetti importanti da verificare sono: il controllo del processo di vaccinazione, l'accertamento della presenza di rischi di infezione di campo, la valutazione della protezione vaccinale e la determinazione del patotipo del virus.
- I ceppi di virus della MD altamente immunosoppressori (vv+MDV – MDV-IS), causano gravi problemi poiché possono limitare la risposta immunitaria cellulo-mediata verso altre malattie. I virus MDV-IS possono essere presenti anche senza causare atrofia degli organi linfatici e/o comparsa di neoplasie. Sono anche difficili da prevenire, poiché programmi vaccinali pienamente efficaci verso virus oncogeni possono non esserlo verso i virus MDV-IS tardivi. Il loro controllo sarà una delle maggiori sfide per l'industria avicola in futuro. I punti critici relativi alla MD sono riassunti nella **tabella 9**.
- ***Dopo la diagnosi di ogni singolo episodio di MD, è di fondamentale importanza la scelta del vaccino o dell'associazione di vaccini con la più alta capacità protettiva.***

La Malattia di Marek (MD) è una malattia linfoproliferativa dei polli causata da un herpesvirus, il virus della Malattia di Marek (MDV). Per l'industria avicola, la MD, in assenza di metodi di controllo appropriati, rappresenta uno dei maggiori rischi di subire gravi danni economici. La MD è stata controllata con la vaccinazione dal 1968 (11,36). Tuttavia, l'MDV ha acquisito maggior virulenza ed i nuovi virus emergenti, non sono solo in grado di superare l'immunità vaccinale, ma hanno anche una forte azione immunosoppressiva. In questo bollettino tecnico passeremo in rassegna gli aspetti della malattia che si considerano importanti per la sua diagnosi e controllo nei polli riproduttori.

La MD è evoluta da quando è stata per la prima volta descritta da Josef Marek nel 1907 (27). All'inizio si presentava come una polineurite, caratterizzata da infiammazioni dei nervi periferici, che colpiva i soggetti adulti senza causare elevata mortalità. A partire dal 1960, in seguito alla crescita dell'avicoltura intensiva, la MD è diventata un problema a livello mondiale e si è manifestata, più che con un quadro infiammatorio, soprattutto con l'insorgenza di neoplasie (linfomi), non solo sui nervi periferici ma anche nei visceri ed a livello cutaneo. Ha inoltre colpito soggetti molto giovani causando gravi problemi di mortalità. L'industria avicola, così come la conosciamo al giorno d'oggi, non avrebbe potuto esistere senza un adeguato controllo della MD. Negli Stati Uniti, il primo vaccino introdotto sul mercato è stato l'herpesvirus del tacchino (HVT) nel 1970 (36). L'HVT ha avuto grande successo ed ha tenuto sotto controllo la malattia per più di un decennio. Tuttavia, negli anni '80, sono comparsi episodi di MD in polli vaccinati con HVT e, a questo punto, è stato utilizzato un nuovo vaccino: HVT+SB1 (7,33,37). Questo vaccino si basava sul sinergismo che si manifesta nella capacità protettiva quando l'HVT viene somministrato in associazione al ceppo SB-1, appartenente al sierotipo 2. Negli anni '90 sono stati riportati episodi di MD in gruppi vaccinati con HVT+SB-1 ed è stato introdotto il ceppo CVI988 (Rispens) (30,38). In altre parti del mondo (ad es. in Europa), il ceppo Rispens è stato introdotto sin dal 1972 e, dove era registrato, è stato continuamente utilizzato, da solo o in associazione con HVT o HVT+SB-1. Al giorno d'oggi, la MD è caratterizzata dalla presenza di linfomi nei nervi, sulla pelle e nei visceri e può comparire anche in soggetti vaccinati. Il virus della MD induce, in aggiunta alle sopraccitate neoplasie, sindromi neoplastiche in altri distretti (oculari, vascolari, neurologiche) e, soprattutto, immunodepressione.

Uno dei principali problemi riscontrati nell'evoluzione della MD è che l'agente causale, l'MDV, è diventato più virulento. Witter (39) ha valutato la virulenza di 35 ceppi di MDV isolati tra il 1960 ed il 1997. È stato utilizzato un test in grado di evidenziare la capacità dell'MDV di superare l'immunità vaccinale ed i virus sono stati classificati all'interno di un intervallo di valori tra 0 e 100, considerando 100 come espressione del massimo grado di virulenza. La figura 1 illustra il risultato di quello studio e si nota come i ceppi isolati negli anni '60 fossero ceppi virulenti del MDV (vMDV), quelli isolati negli anni '80 avevano maggiore virulenza (very virulent MDV - vvMDV) e gli isolati degli anni '90 manifestavano il maggior grado di virulenza (very virulent plus MDV - vv+MDV).

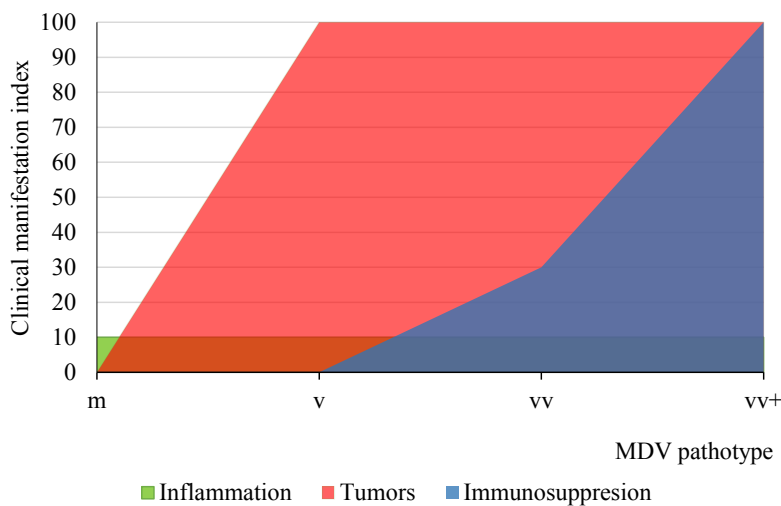
**Figura 1a:** Evoluzione del MDV.



Da: R.L. Witter. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Diseases*, 41:149-63, 1997.

Il virus della MD ha acquisito altre capacità oltre a quella di superare l'immunità vaccinale. I virus che si riscontravano prima del 1960 erano considerati virus a moderata virulenza (mMDV). Questi virus non erano in grado di causare l'insorgenza di tumori ma solo un modesto stato infiammatorio. Mano a mano che i virus acquistavano virulenza aumentava la loro capacità di causare neoplasie. L'ultima loro caratteristica acquisita è stata quella di causare immunodepressione, che ha iniziato a manifestarsi nei vvMDV ed è aumentata nei virus vv+MDV (**Figura 1b**).

**Figura 1b:** Conseguenze dell'evoluzione del MDV sulla Malattia di Marek.



L'immunodepressione causata dall'MDV (MDV-IS) è molto complessa, difficile da diagnosticare in campo (può manifestarsi in assenza di atrofia degli organi linfatici e di neoplasie) ed è difficile da prevenire. I protocolli vaccinali che proteggono efficacemente verso le neoplasie causate dall'MDV, non sempre lo fanno nei confronti della immunodepressione tardiva (MDV-IS), associata ad anomalie nelle risposte immunitarie. L'immunodepressione indotta dall'MDV può influire negativamente sui parametri produttivi (18,24) e sull'efficacia dei programmi vaccinali verso altre malattie (5, 6, 14, 24, 26, 28, 29, 31), sul tasso di mortalità e sulla percentuale di scarti al macello non dovuta a neoplasie.

Il virus della Malattia di Marek ha caratteristiche particolari . La **tabella 1** riassume gli aspetti eziologici, epidemiologici e patogenetici relazionati all'MDV, che hanno significativa influenza sulla diagnosi ed il controllo della MD.

**Tabella 1.** Aspetti importanti dell'infezione da MDV per la diagnosi ed il controllo della MD.

| Caratteristiche biologiche dell'MDV |   | Implicazioni diagnostiche  | Implicazioni sul controllo   |
|-------------------------------------|---|--|--|
| Eziologia                           | MDV rimane associato alle cellule   |  | La gestione della vaccinazione è complessa   |
|                                     | MDV ha un gene oncogeno (meq)   | Può causare tumori in polli anche a tre settimane di età<br><br>Il riscontro della presenza dell'meq nei tumori con l'immunoistochimica è un criterio diagnostico  | Possono essere prodotti vaccini ricombinanti di grande efficacia con la delezione dell'meq in ceppi di MDV appartenenti al sierotipo 1 (ancora in fase sperimentale) |
| Epidemiologia                       | MDV è ubiquitario   | Anche soggetti in salute possono essere infettati da virus oncogeni della MD. Il solo riscontro della presenza di questi virus non ha quindi alcun valore diagnostico  | E' fondamentale ritardare l'infezione riducendo la presenza dell'MDV nelle aziende   |
|                                     | L'MDV si trasmette per via orizzontale per mezzo delle cellule cutanee desquamate, indipendentemente dal livello di protezione vaccinale o dallo stato di salute dei soggetti |  | La vaccinazione non protegge dall'infezione e non impedisce la trasmissione del virus  |
| Patogenesi                          | L'MDV rimane latente nei linfociti  | Vi sono poche copie del virus nelle cellule infette in fase di latenza   |  |
|                                     | L'MDV causa l'insorgenza di linfomi nei polli   | Le cellule infette in fase di latenza hanno molteplici copie del virus. La RT PCR può essere utilizzata per la diagnosi<br><br>I linfomi sono CD4+, CD8-,meq+.<br>La diagnosi può essere fatta con l'immunoistochimica | La corretta vaccinazione previene l'insorgenza di tumori   |
|                                     | L'MDV scompagina la risposta immunitaria, anche in assenza di neoplasie o di atrofia degli organi linfatici   | L'immunodepressione causata dall'MDV è molto difficile da diagnosticare  | L'immunodepressione causata dall'MDV non è ben controllata dai comuni programmi vaccinali  |
|                                     | L'MDV causa tumori nei nervi e nei visceri  | La presenza di neoplasie nei nervi è importante per la diagnosi  |  |

**L'MDV è un herpesvirus che si associa alle cellule.** Questa caratteristica permette all'MDV di eludere l'azione del sistema immunitario e complica parecchio la gestione dei vaccini contro la MD, anch'essi associati a cellule. E' inoltre dotato di un sistema molto efficiente per trasmettersi da un pollo all'altro. Si replica attivamente nell'epitelio dei follicoli delle penne e **si diffonde nell'ambiente e in altri polli attraverso le cellule desquamate e cheratinizzate.** Le cellule morte proteggono il virus dagli insulti ambientali, in questo modo l'MDV persiste nelle aziende per lungo tempo. Inoltre, i soggetti infettati dall'MDV lo saranno per tutta la loro vita, rilasciando continuamente virus nell'ambiente, che si diffonde attraverso l'aria, con le cellule cutanee e la polvere, **E' importante ricordare che la vaccinazione contro la MD protegge contro lo sviluppo di neoplasie , ma non contro l'infezione o la trasmissione dell'MDV.** In situazioni di campo, la maggior parte, se non tutti i soggetti, sono esposti all'MDV molto presto nella loro vita, attraverso l'inalazione di aria, polvere e cellule desquamate che contengono il virus. Questo aspetto è estremamente importante per la diagnosi ed il controllo della malattia. Il riscontro di ceppi di campo dell'MDV in polli non ha alcun significato diagnostico, poiché la maggior parte dei polli è infetta, anche se non svilupperà mai la MD. In aggiunta, è estremamente importante ridurre la carica di virus in azienda, lavando e disinfettando correttamente, per allontanare il momento dell'infezione da MDV il più possibile. Per questo motivo non è consigliabile allevare con promiscuità di età diverse o in allevamenti multi-età, poiché la pressione infettante è solitamente molto elevata in queste strutture.

**L'MDV rimane latente nei linfociti.** Quando i soggetti sono protetti correttamente nei confronti della MD, l'esposizione a MDV di campo porta ad avere una infezione latente nei loro linfociti, in assenza di lesioni. Tuttavia, in caso di immunizzazione non corretta, questa infezione diventerà di tipo neoplastico e si avrà la comparsa di tumori. Una delle maggiori difficoltà nella diagnosi della MD è quella di distinguere i soggetti che manifestano neoplasie dovute all'MDV da quelli che hanno tumori causati da retrovirus, ma hanno anche l'infezione latente da MDV. In altri termini, dobbiamo essere in grado di distinguere tra neoplasie indotte dall'MDV e tessuti infetti dall'MDV latente.

**L'MDV scompagina la risposta immunitaria dei polli.** Questo porta ad avere una grave immunosoppressione, che può danneggiare la risposta immunitaria verso altre malattie ed influire negativamente sulla capacità di sopravvivenza dei soggetti e sui risultati zootecnici.

## DIAGNOSI

La diagnosi differenziale delle malattie neoplastiche nei polli è molto diversa dalla diagnosi di altre malattie. Le principali difficoltà diagnostiche sono riassunte nella tabella 2 e le informazioni al riguardo sono state di recente minuziosamente passate in rassegna (42). **La diagnosi di malattie neoplastiche richiede un approccio multidisciplinare, che deve valutare informazioni di tipo epidemiologico, età, sintomi clinici e lesioni macroscopiche. In qualche caso, questi dati sono sufficienti per formulare una diagnosi. Tuttavia, nella maggior parte dei casi la diagnosi deve essere confermata in laboratorio.**

**Tabella 2.** Difficoltà nella diagnosi differenziale di malattie neoplastiche.

|   |
|---|
| L'infezione da MDV e la Malattia di Marek non sono sinonimi. Quasi tutti i polli subiscono l'infezione da MDV oncogeni ma non vanno incontro a MD.    |
| Neoplasie all'apparenza molto simili possono essere causate da virus diversi (virus della Reticoloendoteliosi - REV, virus della Leucosi - ALV, MDV). |
| Ci sono neoplasie spontanee che macro e microscopicamente sono identiche a quelle indotte da virus.   |
| Ci sono alcune malattie non neoplastiche le cui lesioni possono essere simili a neoplasie (ad es. Neuropatia periferica, Epatite E).                  |
| L'infezione da MDV può dar adito a sindromi non neoplastiche, come l'immunodepressione, che sono molto difficili da diagnosticare in campo.           |

Le tecniche di laboratorio più efficaci per confermare la MD sono l'istopatologia, la RT-PCR e l'immunoistochimica. L'istopatologia è molto utile per differenziare correttamente le cellule tumorali (i linfomi dagli altri tipi di tumore), e per localizzare le lesioni. Tuttavia, in molti casi la sola istopatologia non è in grado di confermare la diagnosi e devono essere utilizzate altre tecniche (RT-PCR e immunoistochimica), per la diagnosi definitiva. Nella **tabella 3** è riportato un riassunto dei criteri che devono essere utilizzati nella diagnosi delle malattie neoplastiche.



**Tabella 3.** Diagnosi differenziale tra Malattia di Marek ed altre malattie neoplastiche o non neoplastiche dei polli.

| Età<br>(settimane)               | Lesioni macroscopiche                        | Diagnosi differenziale                           | Test per confermare la diagnosi            |   |
|----------------------------------|--|--|--|---|
|                                  |  |  | Supporti per la diagnosi                   | Conferma della diagnosi                     |
| <14                              | Turgore dei nervi                            | Malattia di Marek                                | Istopatologia                              | RT-PCR                                      |
|                                  |  | Neuropatia periferica                            |  |   |
|                                  | Neoplasie nei visceri<br>+Turgore dei nervi  | Malattia di Marek                                | Non necessari nella maggior parte dei casi | Non necessaria nella maggior parte dei casi |
| >14                              | Turgore dei nervi                            | Malattia di Marek                                | Istopatologia                              | RT-PCR                                      |
|                                  |  | Neuropatia periferica                            |  |   |
|                                  |  | Reticoloendoteliosi (neurite)                    |  |   |
|                                  | Neoplasie nei visceri<br>+ Turgore dei nervi | Malattia di Marek                                | Istopatologia                              | RT-PCR                                      |
|                                  |  | Neoplasie indotte dal REV                        | Immunoistochimica                          |   |
|                                  | Neoplasie nei visceri                        | Malattia di Marek                                | Istopatologia                              | RT-PCR                                      |
|                                  |  | Neoplasie indotte dal ALV                        | Immunoistochimica                          |   |
|                                  |  | Neoplasie indotte dal REV<br>Neoplasie spontanee |  |   |
| Neoplasie alla Borsa di Fabrizio | Malattia di Marek                            | Istopatologia                                    | RT-PCR                                     |   |
|                                  | Neoplasie indotte dal ALV                    | Immunoistochimica                                |  |   |
|                                  | Neoplasie indotte dal REV                    |  |  |   |

### **Diagnosi in allevamento**

**Età.** L'MDV può causare neoplasie in polli anche a tre settimane di età ma i retrovirus (ALV e REV) necessitano di più tempo (di solito le neoplasie non si riscontrano prima delle 14 settimane, alcune volte anche più tardi).

**Sintomi clinici.** L'MDV può causare problemi di tipo neurologico, come paralisi, torcicollo ed atassia (Immagini 2a & b). Questo non avviene in polli infettati da retrovirus (ALV e REV).

**Lesioni macroscopiche.** Il turgore dei nervi periferici (Immagini 2 c&d) è una delle lesioni più caratteristiche della MD. Se è associata a neoplasie viscerali, può permettere solitamente di diagnosticare la MD già in allevamento. Se però, i nervi periferici sono ingrossati in assenza di neoplasie viscerali, la MD deve essere differenziata dalla Neuropatia Periferica (PN), che è stata descritta solo in linee leggere per la produzione di uova.

**Figura 2.** Sintomi neurologici (a & b) ed ingrossamento dei nervi periferici (c & d) indotti dall' MDV.

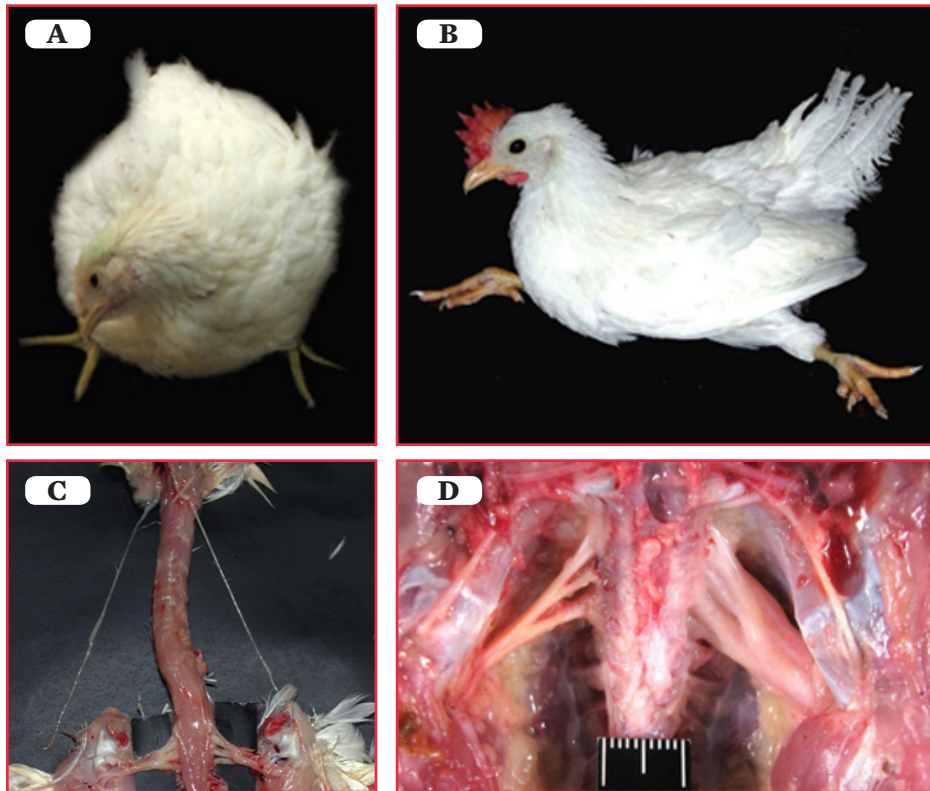
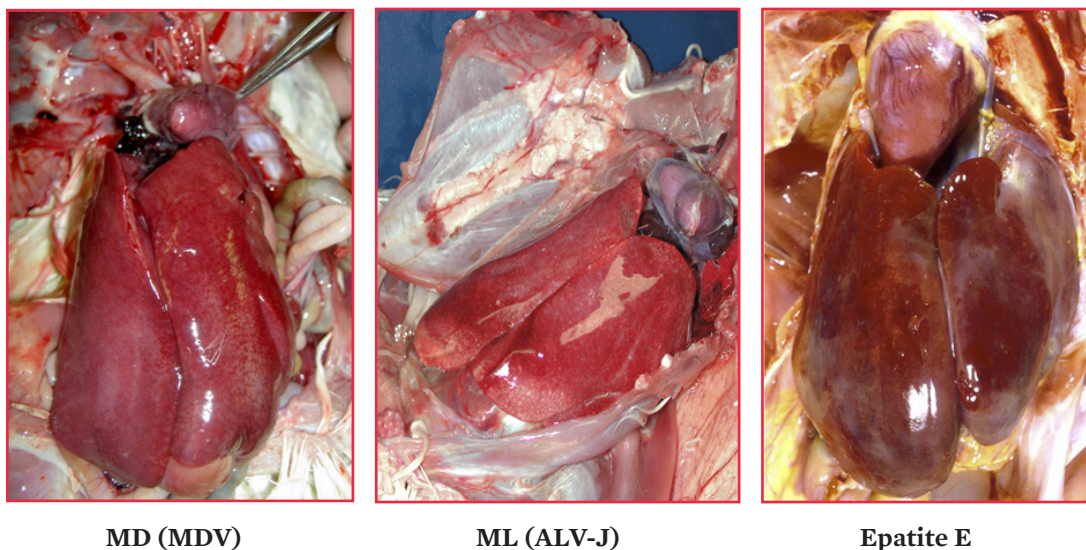


Figure 2a e 2b . Da: I.M. Gimeno and A.R. Pandiri - Virus-induced immunosuppression: Marek's disease virus infection and associated syndromes. - In *Immunosuppressive Diseases of Poultry*, ed I.M.Gimeno, Servet, Zaragoza, Spain.

Le neoplasie viscerali sono un reperto comune nelle malattie neoplastiche da virus nei polli e questo non favorisce la diagnosi differenziale (Figura 3). Nei polli da carne non è infrequente riscontrare solo neoplasie viscerali senza alcun apparente ingrossamento dei nervi, in questi casi la diagnosi dovrebbe essere confermata con la RT-PCR o l'immunohistochimica. Inoltre, alcune lesioni non neoplastiche, come quelle indotte dal virus dell'Epatite E ("Big Liver and Spleen Disease" – BLS), possono essere confuse con neoplasie all'esame necroscopico.

**Figura 3.** MD - Neoplasie ai visceri (Diagnosi differenziale con altre malattie tumorali e non).



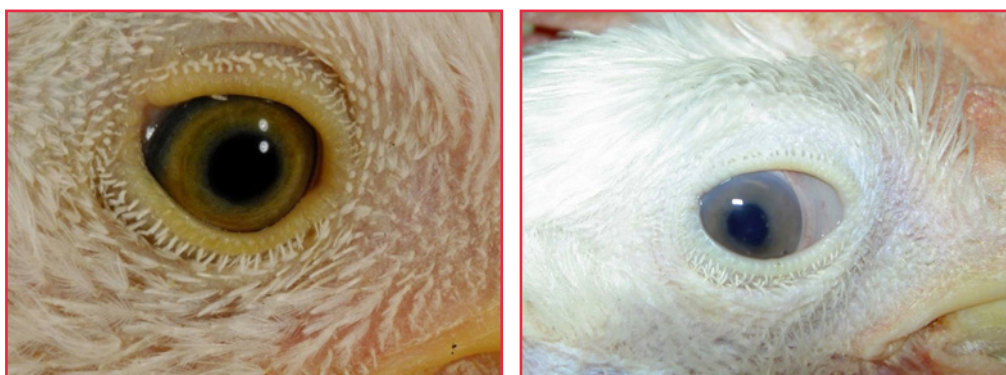
Le lesioni cutanee sono caratteristiche della MD e possono essere estremamente utili per la sua diagnosi (Figura 4). Le tipiche lesioni cutanee sono tumori nodulari presenti nelle aree piumate (**Figura 4a**), anche se possono verificarsi neoplasie sulle zampe, sulla cresta e sui bargigli (**Figura 4b**). Una lesione particolare è denominata “Zampa Rossa dell’Alabama” e si riscontra esclusivamente nelle razze da carne (**Figura 4c**).

**Figura 4.** Neoplasie cutanee causate dall’MDV.



L’ MDV è inoltre in grado di causare panoftalmite, una patologia che può coinvolgere tutte le strutture dell’occhio (**Figura 5**). E’ caratterizzata da pallore dell’iride (occhio grigio – a destra) e da irregolarità nella pupilla. Inoltre, l’MDV può anche causare cataratta, opacità della cornea, degenerazione retinica e pettinite (infiammazione del pettine, struttura anatomica interna dell’occhio dei volatili N.d.T.) . Le lesioni oculari non sono frequenti ma, se presenti, possono orientare verso la diagnosi.

**Figura 5.** Lesioni oculari causate dall’MDV. A sinistra è rappresentato un occhio normale (Figura A) e a destra un occhio colpito da MD (Figura B).

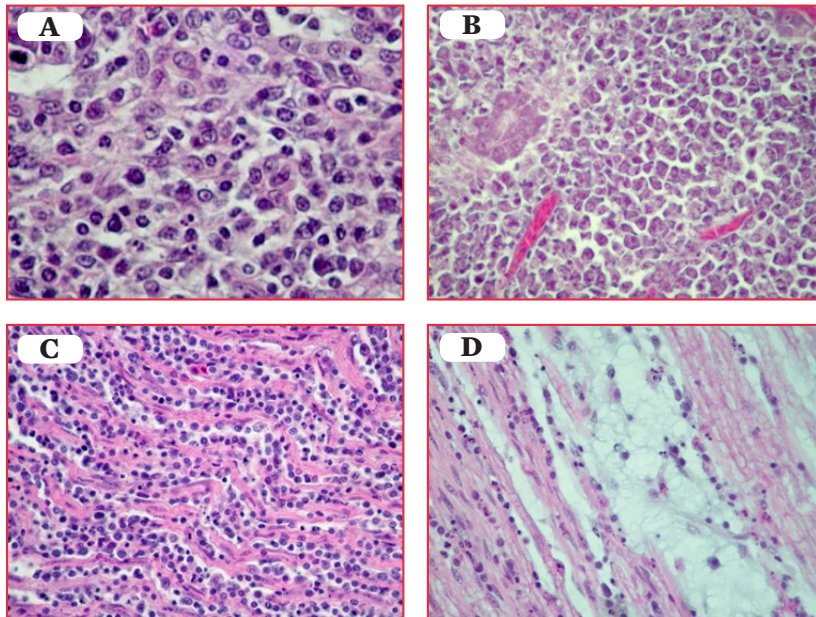


Nella MD possono essere presenti neoplasie alla Borsa di Fabrizio, anche se raramente. In caso si manifestino, è necessario prelevarle per effettuare esami istopatologici ed anche per ricerche virologiche. L’istopatologia ci aiuterà nella diagnosi differenziale tra neoplasie indotte dall’MDV e quelle causate da retrovirus. I test virologici confermeranno se le lesioni sono causate da un retrovirus esogeno o se si tratta di tumori spontanei.

## Diagnosi di laboratorio

**Istopatologia.** I campioni devono essere messi in formalina diluita in soluzione fisiologica tamponata al 10%, in rapporto 10:1 con il volume del campione. L'istopatologia può confermare se la lesione è un linfoma e, a volte, differenziare tra linfomi indotti da MDV o da retrovirus (ALV e REV). I criteri più importanti per confermare le neoplasie da MD con l'istopatologia sono: la sede dei tumori (quelli nei nervi periferici sono patognomonici) e l'eterogenea popolazione cellulare nel tumore (Figura 6). La difficoltà maggiore per diagnosticare le neoplasie da MD è che l'MDV può indurre lesioni infiammatorie in soggetti sani che a volte possono essere confuse con tumori. Questo avviene frequentemente nei nervi, nei quali l'MDV è in grado di indurre due tipologie di lesioni: di tipo A (neoplastiche e che confermano la MD) e di tipo B (infiammatorie e non utili per la diagnosi di MD) (Figura 6). Nel secondo caso si rende necessario l'utilizzo di altre tecniche analitiche per la conferma della diagnosi.

**Figura 6.** Diagnosi della MD con l'Istopatologia. (A: tipiche neoplasie da MD, con popolazione cellulare eterogenea, B: neoplasia causata da ALV caratterizzata da popolazione cellulare omogenea, C: lesioni di tipo A (tumori) indotte da MDV, D: lesioni di tipo B causate da MDV in un nervo (edema ed infiltrazione plasmacellulare).



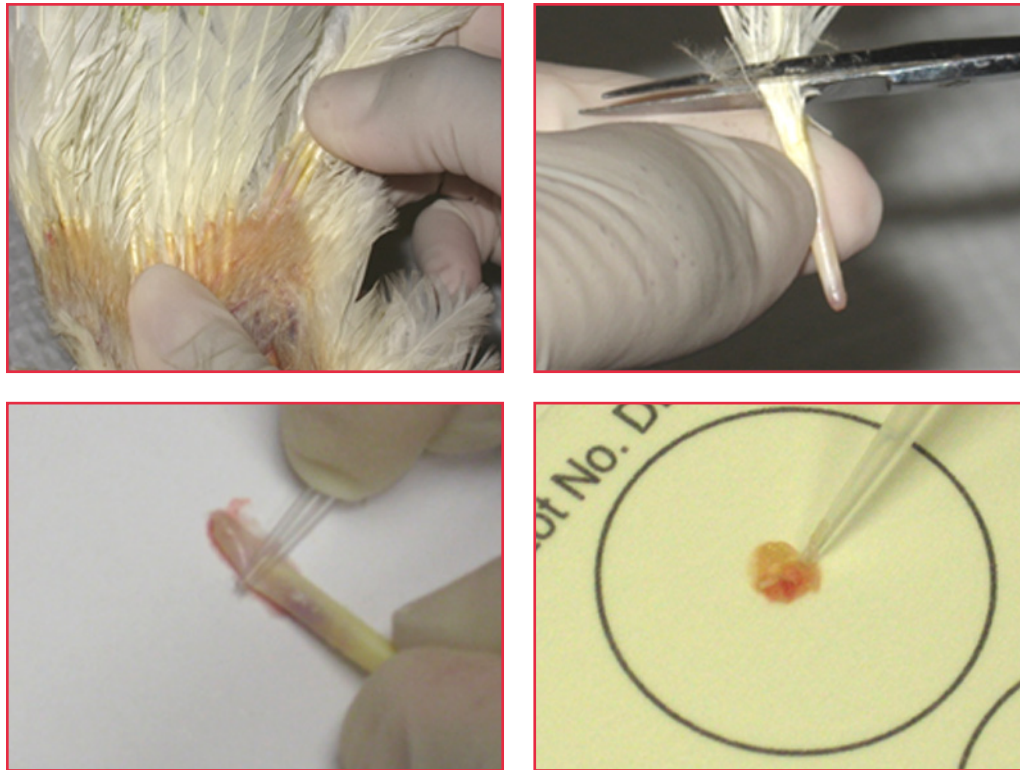
L'analisi istopatologica dei tumori nella Borsa di Fabrizio si rivela molto utile per la diagnosi differenziale tra neoplasie da MD e neoplasie dovute ad altre eziologie. L'MDV causa neoplasie interfollicolari mentre i tumori indotti da retrovirus esogeni (ALV e REV) ed i tumori spontanei sono intrafollicolari. **Poiché non è possibile differenziare tra le neoplasie indotte da retrovirus esogeni (ALV e REV) ed i tumori spontanei, nel caso di tumori intrafollicolari è necessario effettuare conferme di tipo virologico.**

La diagnosi delle neoplasie in avicoltura solo con l'istopatologia è complessa e non sempre possibile. E' molto importante che un laboratorio specializzato riceva campioni di organi diversi (occhio, Borsa di Fabrizio, nervi periferici, cute, visceri, ecc).

**Immunoistochimica (IHC).** Il fenotipo delle cellule tumorali può essere valutato con l'immunoistochimica e questo è utile dal punto di vista diagnostico. I tumori della MD sono positivi ai marcatori delle cellule T (CD3). Inoltre sono CD4+, CD8- e meq+. Al contrario i tumori indotti dai retrovirus e le neoplasie spontanee sono positivi per i marcatori delle cellule B (IgM) e sono negativi per i marcatori delle cellule T o per l'oncogene dell'MDV meq. La maggior parte dei marcatori cellulari non operano correttamente nei campioni fissati in paraffina e per essi si utilizzano campioni congelati in azoto liquido.

**PCR Real Time.** la quantificazione del genoma dell'MDV nelle neoplasie è un valido criterio per la diagnosi della MD. I tumori indotti dall'MDV hanno un grande numero di copie di DNA del virus. Al contrario, i tumori indotti da retrovirus oppure i tumori spontanei, in animali che hanno una infezione latente da MDV, avranno una carica di DNA virale molto bassa. La diagnosi di MD con la RT-PCR, può essere fatta utilizzando tessuti neoplastici, nervi, follicoli delle penne e sangue (13). I campioni possono essere conservati congelati a -70°C o raccolti in carte FTA®. La raccolta di campioni di follicoli delle penne su carte FTA® è descritta in dettaglio nella **Figura 7** (Immagini ottenute da <http://www.aaap.info/frequently-asked-questions-on-viral-tumor-diseases>). In particolare, il sangue ed i follicoli delle penne possono essere utilizzati per la diagnosi precoce della MD a partire dalla terza settimana di età, prima che i soggetti manifestino sintomi o lesioni della malattia (13,16).

**Figura 7.** Raccolta di campioni per Immunoistochimica e RT-PCR.



**Isolamento dei virus/Identificazione dei retrovirus.** L'isolamento dell'MDV non ha alcun valore diagnostico, poiché anche soggetti sani sono in genere infetti con virus di campo oncogeni. E' tuttavia uno strumento necessario se si vogliono portare avanti prove di patotipizzazione. L'isolamento dell'MDV può essere fatto da globuli bianchi periferici ("buffy coat"), da splenociti e dai tessuti neoplastici. Le cellule devono essere vitali per assicurare la sopravvivenza dell'MDV. La milza ed i campioni di tessuto neoplastico devono essere analizzati immediatamente dopo l'eutanasia dei polli. Le sospensioni di cellule neoplastiche e spleniche possono essere congelate in azoto liquido utilizzando il Dimetilsolfossido (DMSO). Le sospensioni cellulari congelate possono essere spedite al laboratorio diagnostico in ghiaccio secco. I campioni di sangue possono essere spediti in giornata refrigerati. In alternativa i globuli bianchi possono essere isolati, congelati in DMSO e spediti congelati in ghiaccio secco.

L'isolamento e la caratterizzazione dei retrovirus sono necessari nella maggior parte dei casi per confermare la presenza di un ALV esogeno o di un REV infettivo. L'ALV ed il REV possono essere isolati da tessuti a fresco, dal plasma o dal siero. I campioni possono essere congelati a -70°C. L'isolamento dei virus sarà in grado di confermare la presenza dell'infezione, ma la dimostrazione del loro ruolo nell'insorgenza dei tumori richiede ulteriori indagini. Poiché la maggior parte delle linee genetiche sono esenti da retrovirus esogeni, il riscontro della loro presenza deve essere considerato un campanello d'allarme.

**Tecniche biomolecolari per identificare i retrovirus.** Il miglior modo per differenziare i linfomi indotti da ALV esogeni, retrovirus o linfomi spontanei è di dimostrare le inserzioni clonali e le alterazioni del gene c-myc utilizzando tecniche molecolari. Però, a tutt'oggi lo strumento diagnostico biomolecolare più utilizzato per il riscontro dei retrovirus è la PCR qualitativa standard su campioni di DNA, per dimostrare la presenza del DNA provirale del REV e differenziare tra i diversi sottogruppi dell'ALV (1,16,17). I campioni di tessuto neoplastico possono essere mantenuti congelati a -70°C o raccolti su carte FTA®.

**Sierologia.** Possono essere utilizzati diversi test sierologici per rilevare la presenza di anticorpi contro l'MDV o verso i retrovirus. La ricerca di anticorpi verso l'MDV in gruppi commerciali ha poco significato, poiché tutti i soggetti sono stati vaccinati in incubatoio o sono venuti in contatto con l'MDV patogeno. I test sierologici sono invece utili nella diagnosi delle infezioni da retrovirus, specialmente in gruppi commerciali con riconosciuta negatività verso i retrovirus esogeni.

## CONTROLLO

La biosicurezza, la genetica e la vaccinazione sono gli strumenti più importanti per il controllo della MD ed è fondamentale gestirli al meglio per avere il controllo della malattia. ***L'aspetto più importante collegato alla biosicurezza è quello di riuscire a ritardare il più possibile l'esposizione e l'infezione con l'MDV di campo. I vaccini necessitano di 5-7 giorni per indurre un buon livello immunitario ed è molto importante che i polli non siano esposti all'infezione prima di essere completamente protetti. Idonee misure di biosicurezza, come un corretto periodo di vuoto tra due gruppi, la pulizia e le disinfezioni, il controllo dei visitatori, le docce, i gruppi ad immissione singola, l'impedire il contatto con gruppi più vecchi o con la polvere prodotta da allevamenti vicini, ecc, sono misure che devono essere messe in atto per ritardare l'infezione precoce.***

**La Genetica** è stato il primo strumento sviluppato per il controllo della MD. Sin dal 1962 (12), si sa che la selezione verso certi aplotipi del Complesso Maggiore di Istocompatibilità, portava ad avere soggetti più resistenti alla MD. Da allora, la resistenza alla MD è stata introdotta tra i criteri di selezione dalle aziende genetiche. In aggiunta, sono stati fatti numerosi studi per identificare altre aree del genoma relazionate alla resistenza alla MD e le conoscenze a questo livello stanno aumentando velocemente (9,10).

**La vaccinazione è stata sin dal 1968 una pietra miliare nella protezione contro la MD. Poiché i vaccini della MD sono associati a cellule, la loro gestione e la gestione della vaccinazione sono attività complesse e delicate. Inoltre, nell'impostare un programma vaccinale, dobbiamo prendere in considerazione diversi aspetti: il tipo di vaccino, la dose vaccinale, l'età/via di somministrazione e l'effettuazione di una singola/doppia vaccinazione.**

**Tipi di vaccino.** la classificazione dei vaccini contro l'MD è riassunta in **tabella 4**.

**Tabella 4.** Classificazione dei vaccini contro la MD.

| Criteri                  | Tipi   | Descrizione   |
|--------------------------|--|---|
| Sierotipi                | 1  | I ceppi di MDV del sierotipo 1 sono stati attenuati con passaggi seriali in colture cellulari (metodo convenzionale) o attraverso modificazioni genetiche (vaccini ricombinanti). Il ceppo CVI988 o ceppo Rispens è il vaccino da sierotipo 1 più utilizzato. I vaccini ricombinanti da sierotipo 1 sono ancora in fase sperimentale.   |
|                          | 2  | I vaccini appartenenti al sierotipo 2 di MDV sono ceppi naturalmente non oncogeni, isolati da polli (ad. es. il ceppo SB1 ed il 301B) e sono utilizzati in associazione al sierotipo 3 in vaccini bivalenti, oppure insieme ai sierotipi 1 e 3 in vaccini trivalenti. Non offrono una protezione completa se utilizzati singolarmente e quindi non sono mai utilizzati da soli.   |
|                          | 3  | I ceppi del sierotipo 3, sono naturalmente non oncogeni e sono stati isolati da tacchini (sono di solito identificati come Herpesvirus del tacchino o HVT). Sul mercato esistono due tipi di vaccini HVT: convenzionale (non geneticamente modificato) e ricombinante (rHVT), che è associato a geni di altri virus, come l'IBDV (virus della Bursite Infettiva), l'NDV (virus della Malattia di Newcastle), l'AIV (virus dell'Influenza Aviaria), l'ILTV (virus della Laringotracheite Infettiva). |
| L'associazione a cellule | Associati a cellule (congelati in azoto liquido) | Sono i vaccini più comunemente utilizzati, sia convenzionali che ricombinanti, con tutti e tre i sierotipi.   |
|                          | Liofilizzati (crioessiccati)                     | Sono disponibili solo con l'HVT convenzionale. Conferiscono meno protezione rispetto ai vaccini associati a cellule, ma non richiedono lo stoccaggio in azoto liquido (LN2).  |
| Metodo di attenuazione   | Convenzionale                                    | Sono vaccini che sono stati attenuati con passaggi seriali su tessuto-culture o che sono naturalmente non oncogeni. Non sono state fatte modificazioni al loro genoma.  |
|                          | Ricombinanti                                     | Sono vaccini che sono stati geneticamente modificati. Attualmente esistono diversi vaccini ricombinanti che utilizzano l'HVT come vettore (ad es. rHVT-ILT, rHVT-IBDV, rHVT-ND, rHVT-AI).   |

La maggior parte dei vaccini per la MD sono associati a cellule. Solo i vaccini convenzionali HVT sono disponibili liofilizzati e non cellulo-associati. I vaccini liofilizzati HVT si utilizzano solitamente in gruppi di polli di piccole dimensioni oppure nei paesi nei quali la catena del freddo non è garantita (e l'azoto liquido non è disponibile). In ogni caso, la protezione conferita dai vaccini HVT liofilizzati è inferiore rispetto a quella che si ottiene con i vaccini HVT cellulo-associati convenzionali. Questi ultimi, per loro natura, sono difficili da gestire. La loro risospensione e la necessità di essere costantemente miscelati, sono punti critici per ottenere una distribuzione uniforme delle cellule infette. E' fondamentale che, per la gestione del vaccino e per la sua preparazione, siano seguite le raccomandazioni dei produttori e che queste procedure siano regolarmente controllate.

I vaccini associati a cellule possono essere classificati in diversi modi. Se ci si basa sul sierotipo sono divisi in vaccini del sierotipo 1 (ad es. CVI988 o Rispens), del sierotipo 2 (ad es. SB-1, 301B) o del sierotipo 3 (HVT). **I vaccini del sierotipo 1 proteggono meglio in caso di infezione precoce da MDV.** Tuttavia, l'utilizzo di vaccini del sierotipo 1 non è ancora permesso in alcune nazioni ed in questo caso la miglior associazione da utilizzare è tra vaccini contenenti i sierotipi 2 e 3 (ad es. HVT+SB1).

I vaccini con il sierotipo 3 o HVT sono i più utilizzati nei polli da carne, ma nei riproduttori devono essere associati ad altri sierotipi per avere sufficiente protezione. Nonostante non sia stato possibile dimostrare sperimentalmente nella MD la presenza di sinergismo tra i vaccini del sierotipo 1 ed altri sierotipi, il ceppo CVI988 è abbinato frequentemente all'HVT o all'HVT+SB-1. In alcune zone con alta pressione virale di campo, nei polli da carne è necessario associare vaccini del sierotipo 3 con vaccini del sierotipo 2, o con il ceppo Rispens, per ottenere maggior protezione contro la MD.

I vaccini possono essere anche divisi in convenzionali e ricombinanti. I vaccini convenzionali non sono stati modificati geneticamente e tra essi abbiamo ceppi naturalmente non oncogeni (appartenenti ai sierotipi 2 e 3), oppure virus scarsamente oncogeni (appartenenti al sierotipo 1), che sono stati attenuati con passaggi seriali su tessuto-culture. Esistono in commercio diversi vaccini ricombinanti contro la MD che utilizzano l'HVT come vettore. Sono solitamente identificati come vaccini HVT ricombinanti, rHVT o vaccini vettorizzati. Attualmente possiamo trovare rHVT che hanno inserti del virus della Malattia di Newcastle (rHVT-ND), del virus della Laringotracheite (rHVT-LT), del virus della Bursite Infettiva (rHVT-IBD) e del virus dell'Influenza Aviaria (rHVT-AI). I vaccini ricombinanti con HVT hanno il vantaggio di agire con una sola iniezione nei confronti di due virus (l'HVT e l'inserto di un altro virus) e possono essere somministrati in ovo. **Tuttavia, è importante sottolineare che ogni rHVT differisce dagli altri e che tutti differiscono dall'HVT originale.** Inoltre non è superfluo raccomandare ancora di seguire le istruzioni dei produttori, per ottenere la miglior protezione possibile ed evitare possibili fallimenti, come conseguenza dei problemi di interferenza tra vaccini convenzionali e vaccini ricombinanti.

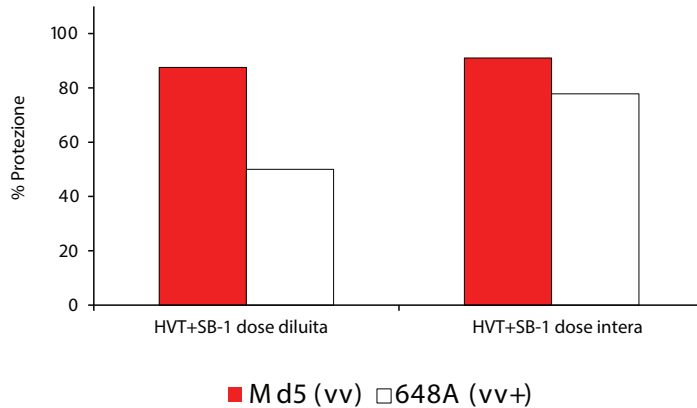
E' estremamente importante essere cauti nel combinare vaccini contro la MD. L'associazione tra i sierotipi 2 e 3 ha portato ad avere un sinergismo nella protezione, sul quale sono stati fatti diversi studi. Inoltre, vaccini con sierotipo 1 possono essere somministrati insieme a vaccini con sierotipi 2 e 3 senza problemi. **Tuttavia, i vaccini rHVT non dovrebbero essere mai associati tra di loro o utilizzati insieme ad un vaccino HVT convenzionale** perché solo uno di essi si svilupperà (probabilmente l'HVT convenzionale) e non ci sarà protezione nei confronti dell'inserto esogeno dell'rHVT che non avrà attecchito. Così pure, se si sta utilizzando un vaccino HVT in ovo, non si potrà somministrare un vaccino rHVT dopo la schiusa perché ci sarà interferenza. **I vaccini contro la MD non dovrebbero essere associati a vaccini contro altre malattie o miscelati ad additivi (antibiotici, vitamine, integratori, ecc.), a meno che questo non sia specificamente permesso dal produttore.**

Infine, è importante ricordare che ogni vaccino **è unico, anche tra quelli della stessa marca.** Il conteggio delle Unità Formanti Placche (PFUs), si effettua per valutare la concentrazione del virus all'interno del vaccino ed il numero di PFU necessario per ottenere la massima protezione, dipende dal vaccino stesso. Per questo motivo, **è fondamentale seguire le raccomandazioni dei produttori.** Sono state descritte le differenze esistenti tra vaccini prodotti da diverse Ditte contenenti il ceppo CVI988 (Rispens) (21,40). Così pure, esistono differenze tra vaccini HVT provenienti da diversi produttori ed anche tra vaccini HVT convenzionali e rHVT.(23). Inoltre, ogni rHVT è unico, anche se si utilizza lo stesso HVT come vettore per inserti diversi oppure se si hanno diversi vettori per lo stesso inserto.

Dose vaccinale (**Figura 8**). I vaccini cellulo-associati della MD sono instabili e difficili da gestire. Vi sono molti fattori che possono influenzare la vitalità delle cellule ed il titolo vaccinale. Per limitare questo problema, i produttori di vaccini tendono ad utilizzare titoli molto più alti rispetto alle 1.500 PFU, che è la dose minima necessaria per essere autorizzati alla vendita negli Stati Uniti (34). Se la vaccinazione sarà fatta correttamente, seguendo le istruzioni dei produttori, la dose che i soggetti riceveranno sarà appropriata. Purtroppo sono ancora abbastanza frequenti errori nella gestione e nella somministrazione dei vaccini, che porteranno all'inoculo di titoli ben al di sotto del livello protettivo per il prodotto utilizzato. Questo fatto accade soprattutto nel settore dei polli da carne, dove, per ridurre il costo, la diluizione dei vaccini è una pratica non infrequente.



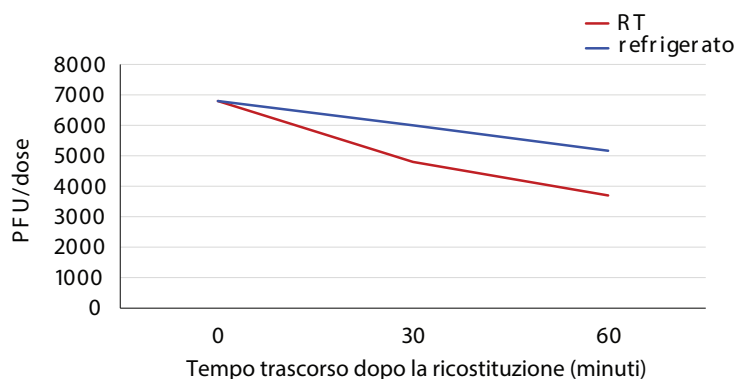
**Figura 8.** Effetto della dose vaccinale sulla protezione contro la MD (Le barre rosse riguardano l'Md5 che è un virus "very virulent" (vvMDV), le barre bianche si riferiscono al ceppo 648A, che è un virus "very virulent plus" (vv+MDV). Gimeno, et al. 2011 Avian Dis. 55:263-272.



Il risultato negativo dopo l'inoculo di una dose non ottimale di vaccino può dipendere da diversi fattori, tra questi i più importanti sono: la patogenicità del virus di campo che infetta i soggetti, il sesso degli animali ed il tipo di vaccino utilizzato (18). Inoltre, il risultato negativo in seguito alla somministrazione di basse dosi, dipende anche dal vaccino utilizzato. Se alcuni vaccini sono in grado di proteggere da infezioni precoci da vv+MDV, altri richiedono dosi più elevate per essere pienamente protettivi (35). **La somministrazione di dosi non ottimali deve essere sempre sconsigliata, perché, anche in caso di assenza di neoplasie, i risultati produttivi possono essere fortemente penalizzati** sia a causa di una protezione non completa che per la comparsa di immunosoppressione indotta dall'MDV (18).

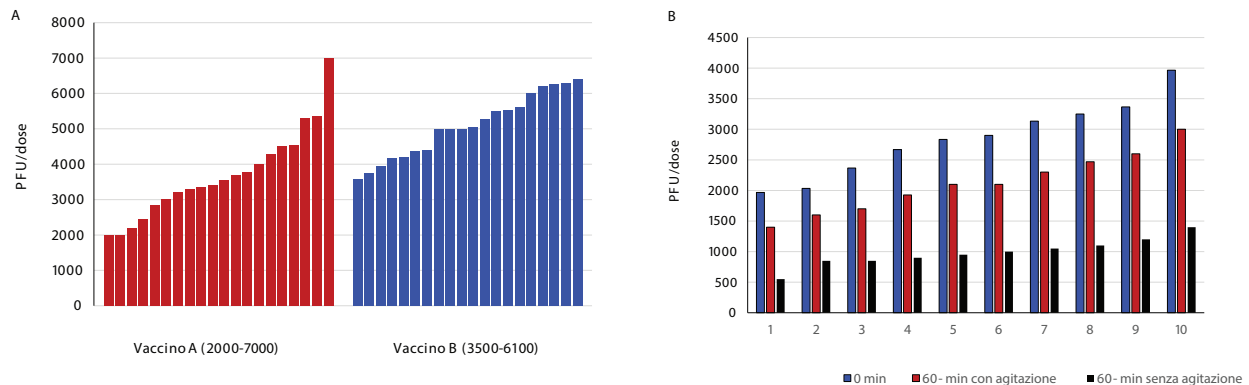
Ci sono diversi fattori che possono ridurre la dose vaccinale. Il più importante è il tempo trascorso tra la ricostituzione e la somministrazione del vaccino (**Figura 9**), abbiamo poi la scorretta miscelazione del vaccino (le cellule infette dovrebbero essere sempre distribuite uniformemente nel diluente (**Figura 10**), l'aggiunta di antibiotici (**Figura 11**) e la diluizione del vaccino per il contenimento dei costi.

**Figura 9.** Effetto del tempo trascorso tra ricostituzione e somministrazione del vaccino sulla riduzione delle PFU (RT= temperatura ambiente; Vaccino a temperatura ambiente: PFU ridotte al 55% in 1 ora; Vaccino refrigerato: PFU ridotte al 76% in 1 ora).

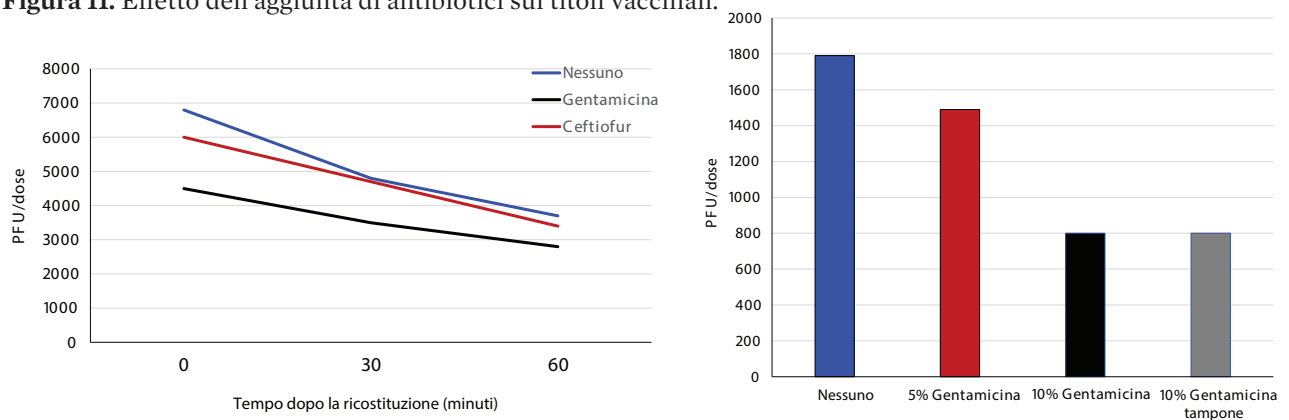


Temperatura ambiente: PFU ridotte al 55% in 1 ora  
 Refrigerato: PFU ridotte al 76% in 1 ora

**Figura 10.** Effetto dell'agitazione del vaccino MD sui titoli vaccinali (A: il vaccino A, evidenziato con le barre rosse, ha titoli in PFU per dose che variano da 2.000 a 7.000, mentre il vaccino B, contraddistinto da barre di colore azzurro, mostra una variabilità in PFU per dose da 3.500 a 6.100. B: il vaccino è stato titolato 10 volte (barre blu), è stato tenuto per 1 ora a temperatura ambiente senza agitazione (barre nere) ed è stato tenuto a temperatura ambiente per 1 ora mantenendolo in agitazione (barre rosse).



**Figura 11.** Effetto dell'aggiunta di antibiotici sui titoli vaccinali.



**Età/Via di somministrazione.** La vaccinazione in ovo (iniezione al diciottesimo giorno di incubazione, durante il trasferimento), è diventata pratica comune nelle ultime decadi. Negli Stati Uniti, tutti i polli da carne e buona parte dei riproduttori sono vaccinati contro la MD in ovo. La vaccinazione in ovo contro la malattia di Marek conferisce una miglior protezione in casi di infezione precoce con l'MDV e potenzia lo sviluppo del sistema immunitario dell'embrione (22). **La somministrazione in ovo di uno qualsiasi tra i vaccini della MD attualmente in commercio, fornisce miglior protezione se paragonata all'iniezione sottocutanea dello stesso vaccino alla nascita** (17, 19). E' stato inoltre dimostrato che la somministrazione in ovo dell'HVT accelera la maturazione del sistema immunitario dell'embrione, il che si traduce in una maggiore capacità dei pulcini di rispondere ad infezioni precoci non solo dell'MDV, ma anche si altri antigeni non relazionati.

**Rivaccinazione.** La somministrazione di una seconda vaccinazione contro la MD può migliorare la protezione in caso di infezione precoce da ceppi di campo molto patogeni di MDV (vv+MDV) ed in altre situazioni, quali l'accasamento in aree ad alta densità di allevamenti, in aziende multi-età, in caso di riutilizzo della stessa lettiera e su riproduttori che vengono trasferiti a grandi distanze. Entrambi i vaccini devono essere somministrati in anticipo rispetto all'infezione di campo. Si raccomanda di somministrare il primo vaccino in ovo ed il secondo alla schiusa. I punti importanti della tecnica della rivaccinazione sono riassunti nella **Tabella 5**.

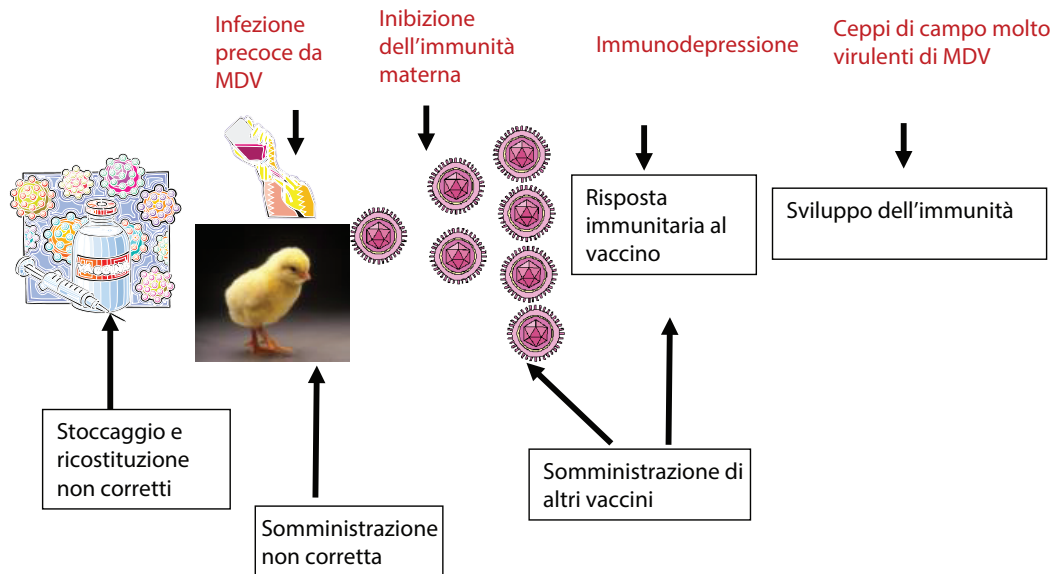
**Tabella 5.** Aspetti importanti della doppia vaccinazione (Gimeno et al., 2012 Avian Dis. 56:295-305, Gimeno et al., 2012 Avian Pathology, 41:59-68).

|   |
|---|
| Si ottiene un risultato migliore se il secondo vaccino è più protettivo rispetto al primo         |
| Miglior protocollo vaccinale: prima vaccinazione in ovo, seconda vaccinazione ad 1 giorno di vita |
| Motivazione: la somministrazione di HVT in ovo accelera la maturazione del sistema immunitario    |
| La vaccinazione effettuata dopo l'infezione di campo non ha alcun significato                     |

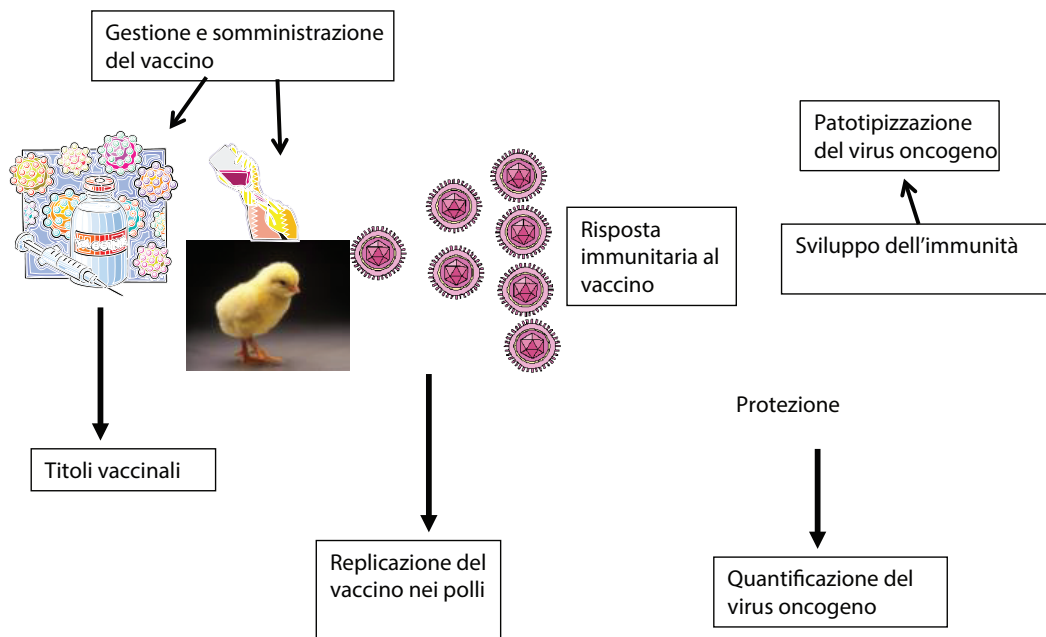
## ANALISI DI UN EPISODIO DI MALATTIA DI MAREK

Dopo aver confermato un caso di Malattia di Marek, è importante analizzare i fattori che possono aver causato la mancata immunizzazione. La **Figura 12** riassume i punti critici che conducono a rotture di immunità e la **Figura 13** illustra le verifiche che possono essere effettuate.

**Figura 12.** Punti critici che determinano rotture di immunità.



**Figura 13.** Aspetti da valutare durante l'immunizzazione.



## CONTROLLO DELLA VACCINAZIONE

**Audit sulla vaccinazione:** i vaccini contro la MD sono associati a cellule e richiedono una cura particolare durante lo stoccaggio, la ricostituzione e la somministrazione. Tali vaccini si conservano in azoto liquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Il loro scongelamento deve essere fatto in acqua tiepida ( $27^{\circ}\text{C}$ ) e deve avvenire in 30-60 secondi (agitando continuamente la/le fiale/te per facilitare il processo). Successivamente devono essere immediatamente ricostituiti immettendoli entro 30-60 secondi nel diluente specifico preparato per loro dal produttore. ***I vaccini contro la MD sono sospensioni instabili di cellule e la mancata miscelazione dei contenitori determina scarsa uniformità nel dosaggio, inoltre l'agitazione periodica evita la sedimentazione delle cellule.*** I vaccini ricostituiti devono essere mantenuti refrigerati e devono essere utilizzati in poco tempo (30-60 minuti). L'aggiunta ai vaccini contro la MD di antibiotici, di additivi o di altri vaccini potrebbe far diminuire drasticamente il titolo vaccinale. Bisogna evitare la contaminazione dei vaccini con batteri, mantenendo la sterilità durante la miscelazione e l'igiene nella stanza della loro preparazione. Devono essere utilizzati per la miscelazione nel diluente aghi di diametro corretto. Gli aghi troppo sottili (con calibro inferiore a 18), possono danneggiare le cellule e la vitalità del virus vaccinale.

In seguito ad un episodio di MD, le Ditte produttrici del vaccino devono condurre un audit in incubatoio per verificare che i vaccini siano stati correttamente gestiti e che nessuno dei passaggi sopra menzionati sia stato omissso. I punti critici da verificare sono riassunti nella **Figura 14** e nella **Tabella 6**.

**Figura 14.** Punti critici dell'audit sulla vaccinazione in incubatoio.

Stoccaggio



Il corretto stoccaggio in azoto liquido del vaccino associato a cellule della MD è essenziale per la sopravvivenza del virus.



Le fiale del vaccino devono essere conservate e spedite in azoto liquido in posizione invertita. La fiala a sinistra è normale, con il vaccino congelato alla base. Nella fiala a destra si evidenzia che il vaccino si è trasferito nel cappuccio, in seguito a scongelamento ed a ricongelamento. Questo vaccino è danneggiato e non deve essere utilizzato.

Scongelamento  
(in bagno termostatico)



Gradi Centigradi

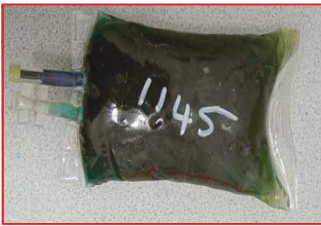


Gradi Fahrenheit

Ricostituzione



Ricostituzione del vaccino in sterilità.



Sacca di vaccino preparata e pronta all'uso. Alla sacca è stato aggiunto il colorante ed è contrassegnata con l'ora della ricostituzione.

Somministrazione  
(verifica sui pulcini)



Verifica sui pulcini (nessun vaccino somministrato, evidenziato dall'assenza di colorante).



Verifica sui pulcini (soggetto vaccinato, evidenziato dalla presenza del colorante sotto la cute).

**Tabella 6.** Punti critici per l'audit sulla vaccinazione in incubatoio.

| Fase   | Checkpoints  |
|--|--|
| Ricevimento e stoccaggio del vaccino                                       | Il vaccino deve essere completamente immerso in azoto liquido (verificare sempre e registrare)   |
|  | Registrare i numeri dei lotti di vaccino   |
|  | Conservazione delle fiale in azoto liquido in posizione invertita per percepire eventuali scongelamenti  |
| Scongelo del vaccino   | Il bagno termostatico deve essere pulito (con cura e con l'utilizzo di disinfettanti)  |
|  | Mettere la fialetta su ghiaccio subito dopo la rimozione dall'azoto liquido  |
|  | Scongelo del vaccino in acqua tiepida per alcuni secondi e poi riporlo su ghiaccio   |
|  | Asciugare la fialetta per evitare la contaminazione del vaccino all'apertura   |
| Ricostituzione   | Utilizzare il diluente sterile consigliato (con indicatore di pH)  |
|  | Utilizzare guanti sterili per ricostituire e maneggiare il vaccino   |
|  | Utilizzare aghi di diametro superiore o uguale a 18 per rimuovere il vaccino dalla fiala   |
|  | Risciacquare la fiala con diluente per trasferire tutto il vaccino nel diluente  |
|  | Miscelare accuratamente il vaccino nel diluente  |
|  | Annotare l'ora della ricostituzione del vaccino  |
|  | Non aggiungere altre sostanze al diluente a meno che sia nota la loro innocuità per il vaccino   |
|  | Se si utilizza un colorante per controllare l'avvenuta vaccinazione dei pulcini, verificare che il vaccino non sia contaminato da batteri          |
|  | Mantenere le condizioni di sterilità per evitare contaminazioni batteriche nel vaccino ricostituito  |
| Non sottodosare il vaccino. Utilizzare la dose raccomandata dal produttore |  |
| Somministrazione   | Mantenere refrigerato il vaccino ricostituito  |
|  | Agitare spesso il vaccino (almeno ogni 10-15 minuti). Le cellule tendono a sedimentare e devono essere riportate in sospensione                    |
|  | Assicurarsi che i vaccinatori automatici o la macchina vaccinatrice in ovo siano sterili, ma senza residui di disinfettanti                        |
|  | Utilizzare per vaccinare aghi di calibro superiore o uguale a 20 e verificare che non siano intasati. Controllare il regolare flusso del vaccino   |
|  | Se si immette il colorante nel vaccino per la vaccinazione dei pulcini di 1 giorno, verificare che l'intervento sia stato effettuato correttamente |
|  | Non utilizzare il vaccino ricostituito per più di 30-60 min  |
|  | Controllare la vitalità delle cellule all'inizio ed alla fine della somministrazione di una sacca di vaccino ricostituito                          |
| In generale  | Effettuare una adeguata formazione delle persone coinvolte nella gestione dei vaccini MD   |
|  | Mantenere una adeguata formazione sulle tecniche di sterilità  |
|  | Controllare le contaminazioni in campioni di vaccino, su vaccinatori automatici, su bagni termostatici, ecc  |

**Titolazione dei vaccini (test sulla formazione di placche).** I vaccini contro la MD possono essere titolati con la prova del conteggio delle unità formanti placche (32). E' importante che la prova sia eseguita non solo direttamente sul contenuto della fiala, ma anche sul vaccino ricostituito. Purtroppo, il metodo non è di facile esecuzione perché richiede attrezzature per la coltura cellulare, che molto probabilmente nessun incubatoio possiede. Gli aspetti importanti sulla titolazione del vaccino sono riassunti nella **Tabella 7**. Un'alternativa per verificare la gestione della vaccinazione in incubatoio può essere il conteggio delle cellule vitali. Anche se questa tecnica non fornisce informazioni su quanto virus vaccinale sia presente nel vaccino, può almeno indirettamente mettere in luce episodi di errata gestione, nel caso in cui il numero delle cellule morte sia molto alto o cresca rapidamente dopo la ricostituzione.

**Tabella 7.** Aspetti importanti sulla titolazione dei vaccini.

|   |
|---|
| Ci fornisce il numero di Unità Formanti Placche (PFU) presenti nella dose vaccinale somministrata                                 |
| Deve essere effettuata sul vaccino dopo la ricostituzione   |
| I vaccini sono composti da cellule in sospensione ed il dosaggio è diversificato all'interno della fiala (variabilità nelle dosi) |
| Sul vaccino devono essere fatte diverse titolazioni (10-20 replicazioni)  |
| I risultati possono essere diversi tra un laboratorio e l'altro in funzione delle metodiche di coltura cellulare                  |
| Devono essere effettuate in laboratori con esperienza sulle colture cellulari per la MD   |

Replicazione del vaccino: può essere valutata quantificando il DNA del virus vaccinale presente nei follicoli delle penne o nella milza. I principali aspetti sul controllo della vaccinazione con la RT-PCR sono riassunti nella **Tabella 8**.

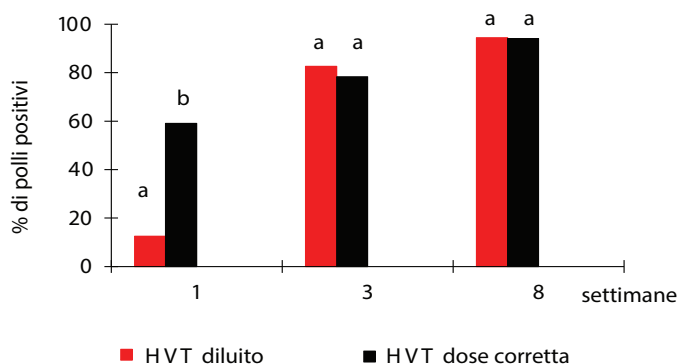
**Tabella 8.** Monitoraggio sulla vaccinazione con RT-PCR. Aspetti importanti.

|  |
|--|
| Questa tecnica è in grado di differenziare i sierotipi , inclusa la differenziazione tra CVI988 ed i ceppi oncogeni dell' MDV  |
| La raccolta dei campioni deve essere fatta ad una settimana di età   |
| Si consiglia di raccogliere campioni di follicoli delle penne o della milza (i campioni di sangue danno risultati falsi negativi)  |
| La percentuale di soggetti vaccinati dipende dal vaccino utilizzato (dal sierotipo e dalla provenienza del vaccino), dalla via/età di vaccinazione, dalla dose somministrata e dalle associazioni tra vaccini utilizzate |
| Fornisce informazioni sull'efficacia della somministrazione del vaccino  |
| Non fornisce informazioni sull'efficacia dell'azione del vaccino (sulla reale immunizzazione del gruppo)   |
| Deve essere effettuata in laboratori con esperienza, in particolare quando si controlla il ceppo CVI988 in campo, poiché la tecnica richiesta per differenziarlo dai virus oncogeni è complessa                          |

Il controllo sul sangue non è consigliato perché ha dato molti esiti falsi negativi (13). I risultati ottenuti su campioni di milza e follicoli delle penne sono molto simili. I follicoli delle penne hanno il vantaggio di poter essere prelevati da soggetti vivi (2,13). E' importante fare campioni su singoli soggetti. I campioni possono essere congelati a -70°C o raccolti su carta FTA® e mantenuti a temperatura ambiente.

**Il momento migliore per controllare l'efficacia della somministrazione del vaccino è ad una settimana di età** (18, 20). In questo momento è possibile riscontrare differenze tra i soggetti che hanno ricevuto una dose piena del vaccino e tra quelli che hanno ricevuto una dose non ottimale (18,20). A 3 settimane di età il virus vaccinale può essere riscontrato nella maggior parte dei soggetti indipendentemente dalla dose vaccinale ricevuta (3,18,20) (**Figura 15**).

**Figura 15.** Verifica della replicazione del virus vaccinale MD con la RT-PCR (Modificato da Gimeno et al. Avian Dis. 2011,55:263-72). Il grafico mostra la percentuale di pulcini che hanno livelli riscontrabili di HVT e la quantificazione del DNA dell'HVT in follicoli delle penne, 1,3,e 8 settimane dopo la vaccinazione.



La percentuale di polli nei quali il vaccino può essere riscontrato ad una settimana di età dipende dall'età di vaccinazione, dalla dose vaccinale e dal ceppo vaccinale utilizzato. E' importante prendere in considerazione tutti questi fattori nell'interpretazione dei risultati.

Sono stati individuati inneschi o primers specifici per ogni sierotipo (25) e sono abitualmente utilizzati per la differenziazione tra vaccini dei sierotipi 2 e 3 e virus appartenenti al sierotipo 1. Se è stato utilizzato il ceppo vaccinale del sierotipo 1 CVI988, è necessario utilizzare primers specifici per tale sierotipo, che non amplificano con altri MDV del sierotipo 1 (4, 20). Questo test richiede una rigorosa applicazione tecnica e molta attenzione nella sua esecuzione e nell'interpretazione dei risultati.

### ***Il controllo delle infezioni precoci da MDV oncogeni***

Dopo la somministrazione di vaccini contro la MD, devono trascorrere almeno 5-7 giorni per raggiungere un minimo livello di protezione. Nelle aziende, l'infezione con MDV oncogeni avviene spesso prima di 5-7 giorni e questo può compromettere l'efficacia della vaccinazione. ***E' possibile verificare se un gruppo è stato infettato precocemente quantificando la presenza del DNA dell'MDV nei follicoli delle penne, nella milza e nel sangue dei polli ad 1 settimana di età*** (16, 18, 20). E' importante fare campioni su singoli soggetti. I campioni possono essere congelati a -70°C o raccolti su carta FTA® e mantenuti a temperatura ambiente.

### ***Controllo della protezione/diagnosi precoce***

E' stato recentemente dimostrato che la ***quantificazione del DNA dell'MDV nei follicoli delle penne o nel sangue dei polli a non meno di 3 settimane di età può essere utilizzata per prevedere il livello della protezione in un gruppo*** (16, 18, 20). Se si raccolgono campioni di sangue è importante utilizzare l'EDTA come anticoagulante. E' fondamentale non miscelare campioni provenienti da soggetti diversi. I campioni possono essere congelati a -70°C o raccolti su carta FTA® e mantenuti a temperatura ambiente.

In gruppi ben protetti contro la MD, sulla maggior parte dei soggetti si evidenzierà una modica presenza del DNA dell'MDV, compatibile con lo stadio di latenza. Nei gruppi non sufficientemente protetti, invece, si riscontreranno in molti soggetti alti livelli di DNA virale, comparabili con quelli presenti nelle neoplasie indotte dall'MDV.

### ***Patotipizzazione dell'MDV***

Nonostante siano stati fatti diversi tentativi di identificare marcatori molecolari della virulenza, per il momento l'unico modo di patotipizzare i ceppi di MDV isolati, rimane la prova biologica. Il metodo di scelta prevede di misurare la capacità dell'MDV di superare l'immunità conferita da diversi vaccini contro la MD.

- L'HVT è in grado di proteggere dai ceppi di MDV virulenti (vMDV).
- L'HVT+SB1 è in grado di proteggere dai ceppi di MDV molto virulenti (vvMDV).
- Il ceppo Rispens (CVI988) è in grado di proteggere dai ceppi di MDV "very virulent plus" (vv+MDV) (39,41).

Questo test si effettua il polli SPF (specific pathogen free) con anticorpi materni e richiede l'utilizzo di prototipi dell'MDV specifici per ogni patotipo (JM, Md5 e 648A per i ceppi v, vv e vv+ rispettivamente) (39, 41).

Il test richiede lungo tempo ed infrastrutture che sono disponibili solo in pochi laboratori. Tuttavia, nel caso si sospetti di essere in presenza di virus ad alta virulenza, si raccomanda di verificare se il protocollo vaccinale che si sta utilizzando sia in grado di proteggere efficacemente contro questi isolati. Se si rendesse necessaria la patotipizzazione, i campioni possono essere inviati ai laboratori di riferimento per la MD dell'OIE (Organizzazione Mondiale della Sanità Animale).

Vi sono alternative al test di riferimento della patotipizzazione, sono stati descritti: l'atrofia degli organi linfoidi (8), la neuropatotipizzazione (15) e la quantificazione del DNA virale (43). Con tutti questi metodi può essere possibile differenziare tra i virus "virulent" ed i "very virulent", ma non si riesce a distinguere tra i ceppi "very virulent" ed i "very virulent+" dell'MDV. Per questo sono necessarie ulteriori ricerche con lo scopo di semplificare la patotipizzazione dell'MDV e renderla eseguibile da altri laboratori.



**Tabella 9.** Punti chiave da ricordare sulla MD.

|   |
|---|
| <b>La MD è una malattia complessa che evolve nel tempo</b>  |
| <b>Le due conseguenze più importanti delle infezioni da MDV sono le neoplasie e l'immunosoppressione</b>  |
| <b>L'MDV si trasmette sia con le piume infette che con la forfora cutanea e rimane persistente nell'azienda. Nelle normali condizioni d'allevamento ogni pollo è esposto all'MDV e rimane infetto per tutta la vita</b> |
| <b>Un punto critico per il controllo della malattia è riuscire a ritardare l'infezione</b>  |
| <b>Idonei piani vaccinali sono in grado di prevenire l'insorgenza di neoplasie da MDV</b>   |
| <b>Le principali cause di rottura dell'immunità in soggetti vaccinati sono gli errori nella gestione del vaccino MD e l'infezione precoce con l'MDV in azienda</b>  |
| <b>Il personale che gestisce la vaccinazione contro la MD deve essere correttamente formato e devono essere effettuati periodicamente audits sulle procedure di vaccinazione</b>  |
| <b>La vaccinazione deve essere fatta con cura e devono essere attentamente seguite le raccomandazioni dei produttori del vaccino</b>  |
| <b>La diagnosi della MD può essere difficoltosa. Sono disponibili diverse tecniche di laboratorio per confermare la diagnosi di MD</b>  |
| <b>Nel caso che la diagnosi di MD sia confermata, devono essere svolte indagini per identificare le cause dell'episodio e per mettere in atto idonee misure preventive per il futuro</b>                                |
| <b>Le indagini in un caso di MD devono includere l'audit in incubatoio, il controllo della replicazione del virus vaccinale sui soggetti, la diagnosi precoce e la patotipizzazione</b>                                 |
| <b>Attualmente non disponiamo dei metodi idonei per verificare o controllare l'immunosoppressione indotta dall'MDV</b>  |

## RIFERIMENTI

1. Bacon, L.D., R.L. Witter, and R.F. Silva. Characterization and experimental reproduction of peripheral neuropathy in White Leghorn chickens. *Avian Pathol.* 30:487-499. 2001.
2. Baigent, S.J., L.J. Petherbridge, K. Howes, L.P. Smith, R.J. Currie, and V.K. Nair. Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 123:53-64. 2005.
3. Baigent, S.J., L.P. Smith, R.J. Currie, and V.K. Nair. Correlation of Marek's disease herpesvirus vaccine virus genome load in feather tips with protection, using an experimental challenge model. *Avian Pathol* 36:467-474. 2007.
4. Baigent, S.J., L.P. Smith, L.J. Petherbridge, and V.K. Nair. Differential quantification of cloned CVI988 vaccine strain and virulent RB-1B strain of Marek's disease viruses in chicken tissues, using real-time PCR. *Res Vet Sci* 91:167-174. 2011.
5. Biggs, P.M., P.L. Long, S.G. Kenzy, and D.G. Rootes. Relationship between Marek's disease and coccidiosis. II. The effect of Marek's disease on the susceptibility of chickens to coccidial infection. *Vet.Rec.* 83:284-289. 1968.
6. Biggs, P.M., P.L. Long, S.G. Kenzy, and D.G. Rootes. Investigations into the association between Marek's disease and coccidiosis. *Acta Pathol.Vet.Microbiol.Scand.* 38:65-75. 1969.
7. Calnek, B.W., K.A. Schat, M.C. Peckham, and J. Fabricant. Research note - Field trials with a bivalent vaccine (HVT and SB-1) against Marek's disease. *Avian Dis.* 27:844-849. 1983.
8. Calnek, B.W., R.W. Harris, C. Buscaglia, K.A. Schat, and B. Lucio. Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates. *Avian Diseases* 42:124-132. 1998.

9. Chang, S., D. J.R., M. Heidari, L.F. Lee, C.W. Ernst, J. Song, and H. Zhang. Vaccine by chicken line interaction alters the protective efficacy against challenge with a very virulent plus strain of Marek's disease virus in White Leghorn chickens. *World Journal of Vaccines* 2:1-11. 2012.
10. Chang, S., Q. Xie, J.R. Dunn, C.W. Ernst, J. Song, and H. Zhang. Host genetic resistance to Marek's disease sustains protective efficacy of herpesvirus of turkey in both experimental and commercial lines of chickens. *Vaccine* 32:1820-1827. 2014.
11. Churchill, A.E., and P.M. Biggs. Herpes-type virus isolated in cell culture from tumors of chickens with Marek's disease. II. Studies in vivo. *J.Natl.Cancer Inst.* 41:951-956. 1968.
12. Cole, R.K. Citation Classic: Studies on genetic resistance to Marek's disease. *Curr.Contents/Ag.Biol.Env. Sci.* N1:18-18. 1985.
13. Cortes, A.L., E.R. Montiel, S. Lemiere, and I.M. Gimeno. Comparison of blood and feather pulp samples for the diagnosis of Marek's disease and for monitoring Marek's Disease vaccination by real time PCR *Avian Diseases* 55:302-310. 2011.
14. Faiz, N., A.L. Cortes, J.S. Guy, O.J. Fletcher, M. West, E. Montiel, and I.M. Gimeno. Early infection with Marek's disease virus can jeopardize protection conferred by laryngotracheitis vaccines: a method to study MDV-induced immunosuppression. *Avian Pathology* (in press). 2016.
15. Gimeno, I.M., R.L. Witter, and U. Neumann. Neuropathotyping: a new system to classify Marek's disease virus. *Avian Dis.* 46:909-918. 2002.
16. Gimeno, I.M., A.L. Cortes, and R.F. Silva. Load of Challenge Marek's Disease Virus DNA in Blood as a Criterion for Early Diagnosis of Marek's Disease Tumors. *Avian Diseases* 52:203-208. 2008.
17. Gimeno, I.M., R.L. Witter, A.L. Cortes, S.M. Reddy, and A.R. Pandiri. Standardization of a model to study revaccination against Marek's disease under laboratory conditions. *Avian Pathology* 41:59-68. 2011.
18. Gimeno, I.M., A.L. Cortes, E.R. Montiel, S. Lemiere, and A.R. Pandiri. Effect of diluting Marek's disease vaccines on the outcomes of Marek's disease virus infection when challenge with highly virulent Marek's disease viruses. *Avian Diseases* 55:263-272. 2011.
19. Gimeno, I.M., A.L. Cortes, R.L. Witter, and A.R. Pandiri. Optimization of the protocols for double vaccination against Marek's disease using commercially available vaccines: evaluation of protection, vaccine replication, and activation of T cells. *Avian Diseases* 56:295-305. 2012.
20. Gimeno, I.M., J. Dunn, A.L. Cortes, A.E. El-Gohari, and R.F. Silva. Detection and differentiation of CVI988 (Rispen vaccine) from other serotype 1 Marek's disease viruses. *Avian Diseases* 58 2:232-243. 2014.
21. Gimeno, I.M., A.L. Cortes, N.M. Faiz, T. Barbosa, and T. Villalobos. Evaluation of factors influencing efficacy of vaccine strain CVI988 against Marek's disease in meat-type chickens. *Avian Diseases* 59:400-409. 2015.
22. Gimeno, I.M., N.M. Faiz, A.L. Cortes, T. Barbosa, T. Villalobos, and A.R. Pandiri. In ovo vaccination with HVT hasten maturation of chicken embryos immune responses in Specific Pathogen Free Chickens (SPAFAS). *Avian Diseases* 59:375-383. 2015
23. Gimeno, I.M., A.L. Cortes, N.M. Faiz, T. Villalobos, H. Badillo, and T. Barbosa. Efficacy of various HVT vaccines (conventional and recombinant) against Marek's disease in broiler chickens: effect of dose and age of vaccination. *Avian Diseases* in press. 2016.
24. Islam, A.F., C.W. Wong, S.W. Walkden-Brown, I.G. Colditz, K.E. Arzey, and P.J. Groves. Immunosuppressive effects of Marek's disease virus (MDV) and herpesvirus of turkeys (HVT) in broiler chickens and the protective effect of HVT vaccination against MDV challenge. *Avian Pathology* 31:449-461. 2002.
25. Islam, A.F., B. Harrison, B.F. Cheetham, T.J. Mahony, P.L. Young, and S.W. Walkden-Brown. Differential amplification and quantitation of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 119:103-113. 2004.
26. Li, Y., A. Sun, S. Su, P. Zhao, Z. Cui, and H. Zhu. Deletion of the Meq gene significantly decreases immunosuppression in chickens caused by pathogenic Marek's disease virus. *Virol J* 8:2. 2011.

27. Marek, J. Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern. *Deut.Tierarztl.Woch.* 15:417-421. 1907.
28. Randall, C.J., H.G. Grant, and I.H. Sutherland. Coccidiosis with concurrent Marek's disease. *Vet.Rec.* 88:618-618. 1970.
29. Rice, J.T., and W.M. Reid. Coccidiosis immunity following early and late exposure to Marek's disease. *Avian Dis.* 17:66-71. 1973.
30. Rispens, B.H., J. Van Vloten, N. Mastebroek, H.J.L. Maas, and K.A. Schat. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. *Avian Dis.* 16:108-125. 1972.
31. Saseendranath, M.R. Effect of Marek's disease vaccination on immunity to coccidiosis in chicken. *Mysore J.Agr.Sci.* 17:208-208. 1983.
32. Schat, K.A. Isolation of Marek's disease virus: revisited. *Avian Pathol* 34:91-95. 2005.
33. Schat, K.A., and B.W. Calnek. In vitro cytotoxicity of spleen lymphocytes against Marek's disease tumor cells: Induction by SB-1, an apparently non-oncogenic Marek's disease virus. In: *Resistance & Immunity to Marek's Disease*. P.M. Biggs, ed. Commission of the European Communities, Luxembourg. pp 301-316. 1980.
34. USDA. Code of Federal Regulations. In. APHIS, ed. 2009.
35. Villalobos, T., T. Barbosa, A.L. Cortes, and I.M. Gimeno. Differences on Dose Effect of CVI988 Commercial Vaccines Efficacy against an Early Challenge with a Very Virulent Plus Marek's Disease Virus. In: 2013 AAAP/AVMA Annual Meeting. Chicago. 2013.
36. Witter, R.L., K. Nazerian, H.G. Purchase, and G.H. Burgoyne. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Amer.JVet.Res.* 31:525-538. 1970.
37. Witter, R.L., and J.M. Sharma. Polyvalent Marek's disease vaccines - a strategy to protect chickens against challenge with very virulent Marek's disease virus strains. In: *Proc.18th Natl.Mtg.Poultry Health & Condemnations*. pp 138-148. 1983.
38. Witter, R.L., L.F. Lee, and A.M. Fadly. Characteristics of CVI988/Rispens and R2/23, two prototype vaccine strains of serotype 1 Marek's disease virus. *Avian Dis.* 39:269-284. 1995.
39. Witter, R.L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41:149-163. 1997.
40. Witter, R.L., and K.S. Kreager. Serotype 1 viruses modified by backpassage or insertional mutagenesis: approaching the threshold of vaccine efficacy in Marek's disease. *Avian Diseases* 48:768-782. 2004.
41. Witter, R.L., B.W. Calnek, C. Buscaglia, I.M. Gimeno, and K.A. Schat. Classification of Marek's disease viruses according to pathotype: philosophy and methodology. *Avian Pathology* 34:75-90. 2005.
42. Witter, R.L., I.M. Gimeno, A.K. Pandiri, and A.M. Fadly *Tumor Diagnosis Manual: The Differential Diagnosis of Lymphoid and Myeloid Tumors in the Chicken*, First ed. The American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Florida 2010.
43. Yunis, R., K.W. Jarosinski, and K.A. Schat. Association between rate of viral genomereplication and virulence of Marek's disease herpesvirus strains. *Virology*:142-150. 2004.







L'accuratezza e la rilevanza delle informazioni presentate sono state verificate con il massimo impegno. Tuttavia, Aviagen® non accetta responsabilità per le conseguenze dell'utilizzo di queste informazioni nella gestione dei polli.

[www.aviagen.com](http://www.aviagen.com)

Aviagen ed il logo Aviagen sono marchi registrati da Aviagen negli Stati Uniti ed in altri paesi. Tutti gli altri marchi o loghi sono registrati dai rispettivi proprietari.

© 2017 Aviagen.