UNIVERSITA' DI PISA

Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche

# Laringotracheite Infettiva Aviaria:

# Gestione dei focolai nel nord Italia

Candidato: Dott. Nicolò Cinotti

Relatori: Dr.ssa Valentina Ebani

Dr. Luigi Gavazzi

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

***Acta est fabula, plaudite!***

***(Svetonio, Vite dei Cesari)***

# INDICE


| | |
|---|---|
| Indice | Pag. 3 |
| Introduzione | Pag. 4 |
| Herpesvirus | Pag.5 |
| Laringotracheite infettiva aviaria | Pag. 12 |
| Situazione epidemiologica | Pag. 22 |
| Strategie di controllo | Pag. 26 |
| Aspetti pratici | Pag. 28 |
| Conclusioni | Pag. 35 |
| Bibliografia | Pag. 36 |
| Ringraziamenti | Pag. 38 |

# INTRODUZIONE

La Laringotracheite infettiva (ILT) è un'infezione respiratoria di origine virale che colpisce frequentemente i polli (gallus gallus). Tale patologia riveste una grande importanza nel contesto dell'allevamento avicolo industriale alla luce dei severi danni economici che è in grado di apportare al settore a causa della forte mortalità e dello spiccato calo dell'ovodeposizione.

L'infezione è sostenuta da un Herpesvirus: la famiglia Herpesviridae comprende un vasto numero di virus patogeni per vertebrati a sangue caldo e freddo, come pure per invertebrati. La famiglia viene suddivisa in tre sottofamiglie in base al loro comportamento biologico e alla struttura genomica: Alphaherpesvirinae (gruppo HSV), Betaherpesvirinae (gruppo Cytomegalovirus) e Gammaherpesvirinae (gruppo di virus linfoproliferativi). Il virus della ILT è compreso nella sottofamiglia delle Alphaherpesvirinae, nel genere Iltovirus.

# HERPESVIRUS

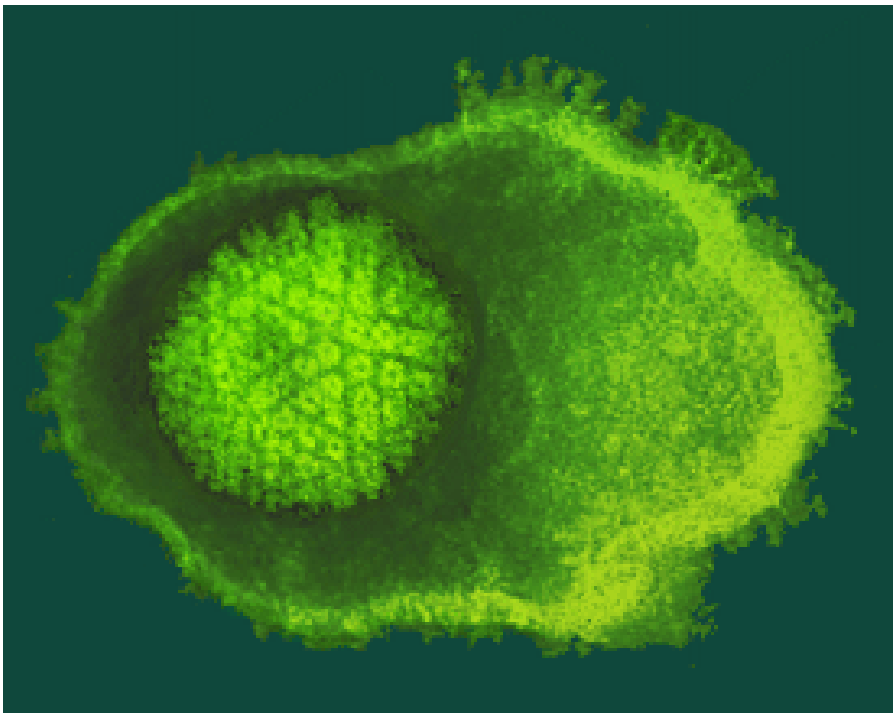

**Figura 1: Herpesvirus, scansione al M.E.**

La famiglia Herpesviridae comprende molti virus, patogeni sia per l'uomo che per molti animali. Le manifestazioni patologiche delle infezioni da herpesvirus sono conosciute fin dall'antichità, tanto che il nome "herpes" deriva da una parola greca che significa "insinuarsi".

Questi virus hanno alcune caratteristiche comuni, ma si differenziano anche per molti aspetti, in modo tale da poterli classificare in tre sottofamiglie sulla base dell'organizzazione del genoma, del tropismo tissutale, della citopatologia, della sede dell'infezione latente, nonché della patogenesi e dei sintomi clinici.

Le tre sottofamiglie sono:

a) Alphaherpesvirinae: sono caratterizzati da uno spettro d'ospite piuttosto ampio e dalla capacità di moltiplicarsi in diversi tipi di colture cellulari in vitro con un caratteristico effetto citopatico e la produzione di inclusioni nucleari. Comprendono il genere Iltovirus (Infectious laryngotracheitis-like viruses), agente eziologico della Laringotracheite infettiva e il genere Mardivirus (Marek's disease-like viruses)

b) Betaherpesvirinae: hanno uno spettro d'ospite ristretto (specie-specifici), si replicano in vitro in colture di fibroblasti della specie animale sensibile, hanno un ciclo di replicazione assai lento e producono inclusioni nucleari e citoplasmatiche.

c) Gammaherpesvirinae: hanno uno spettro d'ospite ristretto e si replicano pressoché esclusivamente in cellule linfoidi.

Gli herpesvirus sono virus ubiquitari e le loro infezioni sono molto diffuse. Nell'uomo sono associati generalmente a patologie benigne, ma possono essere anche responsabili d'elevata morbilità e mortalità in individui immunodepressi.

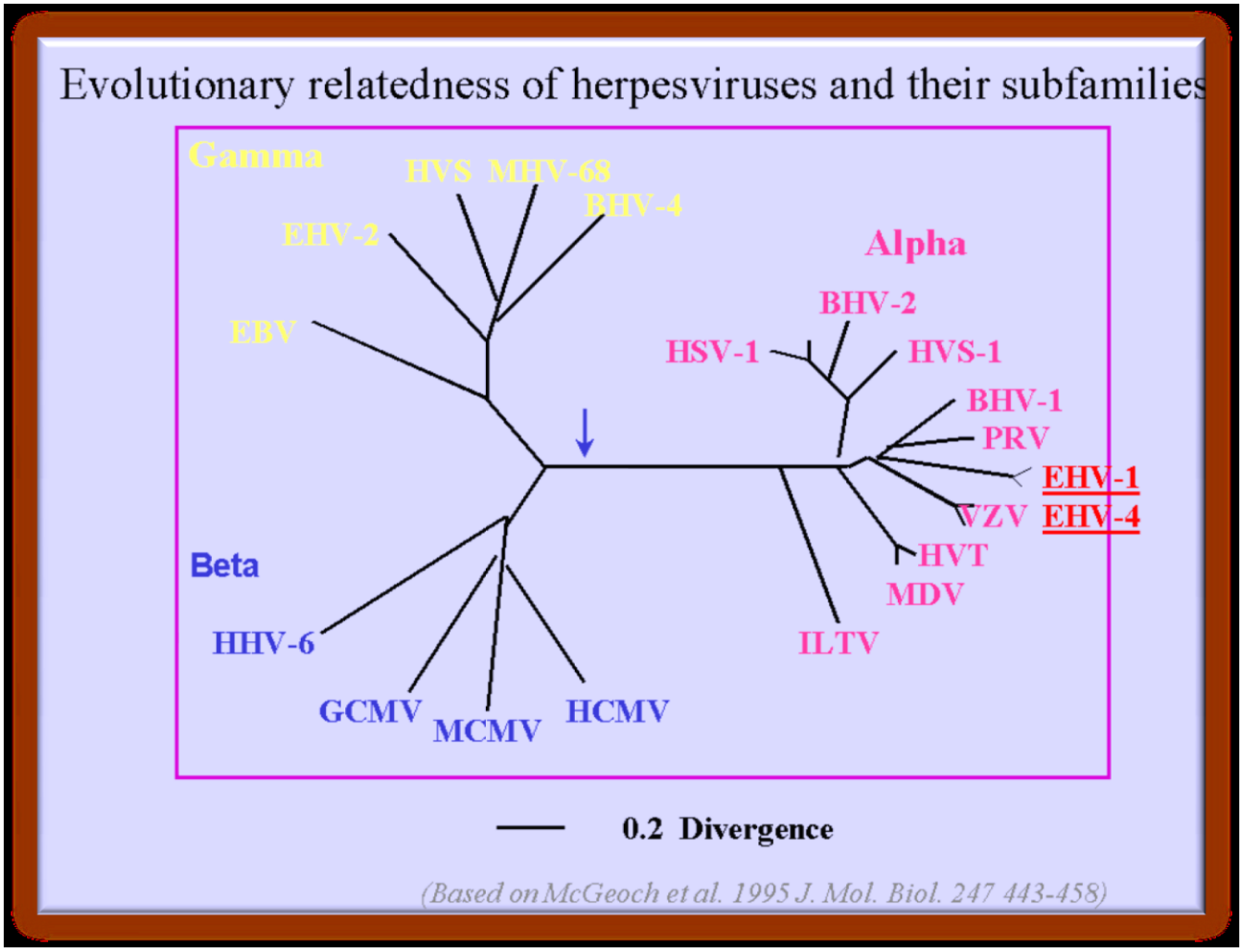


**Figura 2: Albero filogenetico Familia Herpesviridae**

Il virione, di 120-250 nm di diametro, è costituito da un core che contiene il genoma virale protetto da un nucleocapside a simmetria icosaedrica formato da 150 esameri e 12

pentameri, questa struttura è circondata da uno strato proteico il tegumento a sua volta circondato in un bilyer lipidico, l'envelope, che contiene un gran numero di glicoproteine virali, tra cui la gB, gD e gC sono le più rappresentate.

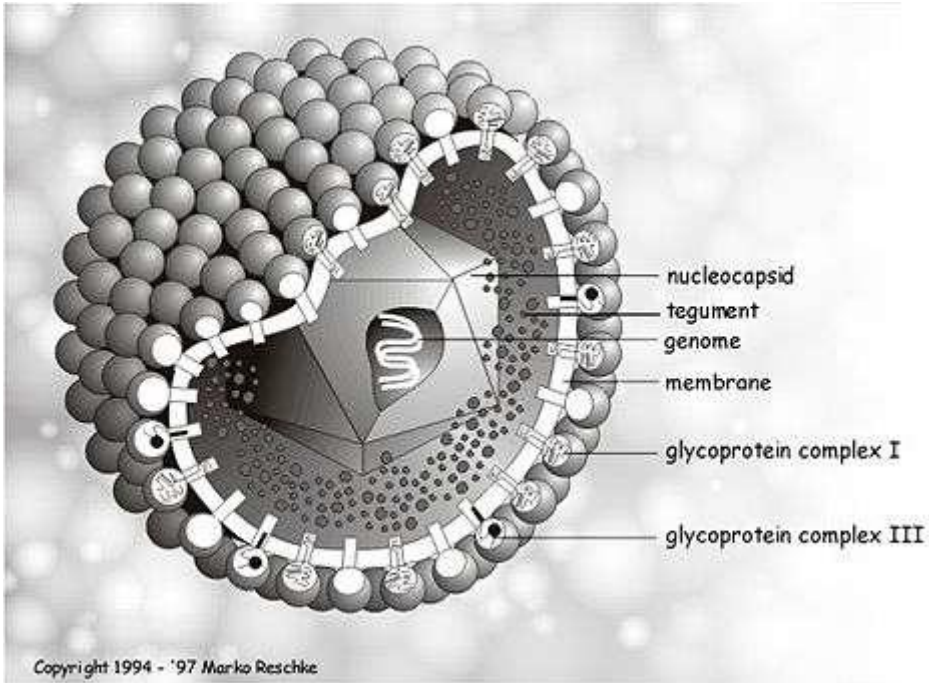


**Figura 3: Struttura Herpesvirus**

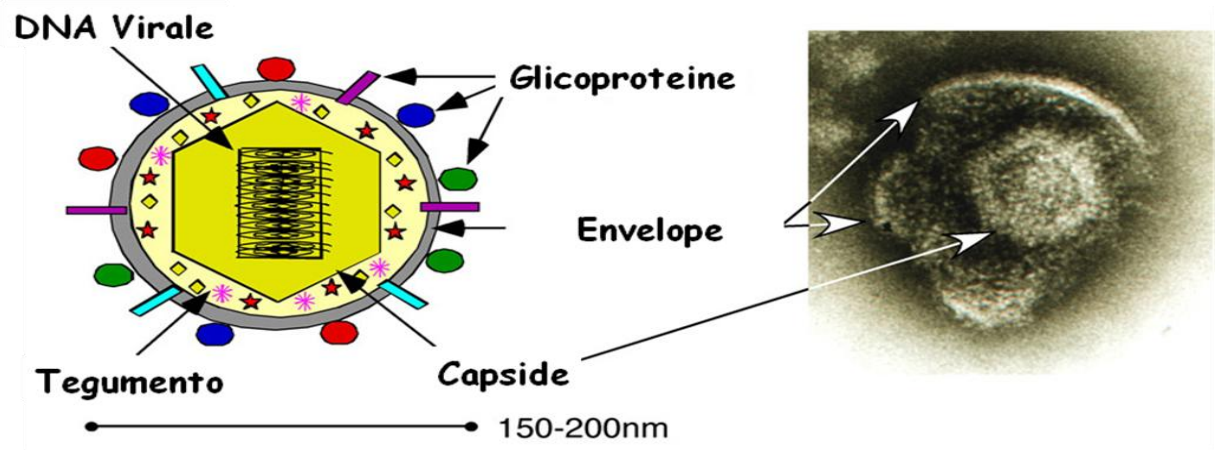


**Figura 4: Herpesvirus - organizzazione del capside**

Il genoma consiste in un doppio filamento di DNA lineare (dsDNA) di 120-220 Kbp, organizzato in un' unità lunga (UL ) e un' unità corta (US ) legate da due sequenze invertite

ripetute chiamate internal repeat (IR) e terminal repeat (TR). Il DNA codifica almeno 80 proteine, di cui circa 20 strutturali. Gli anticorpi neutralizzanti reagiscono con le maggiori glicoproteine localizzate nell'envelope.

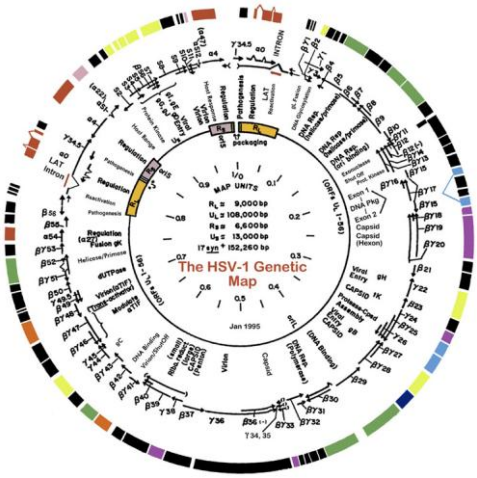


**Figura 5: Herpesvirus - mappa genetica**

Il meccanismo di internalizzazione nella cellula ospite inizia con il legame tra il proteoglicano eparansolfato della superficie cellulare e la gC virale. Fa seguito una specifica interazione con uno dei diversi recettori cellulari chiamati "HVEM" per "herpesvirus entry mediators", che sono recettori collegati al fattore di crescita dei nervi e al tumor necrosis factor. Questo legame coinvolge la gD e da inizio alla fusione delle due membrane attraverso l'interazione di altri componenti cellulari e virali. L'ingresso si completa quando avviene la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare attraverso l'interazione delle gB, gH, gI e gL. Il capside virale con qualche proteina del tegumento migra attraverso i pori nucleari utilizzando i meccanismi di trasporto della cellula ospite. Solo il DNA virale con qualche proteina del tegumento come alfa-tif entra nel nucleo, mentre il tegumento resta nel citoplasma.

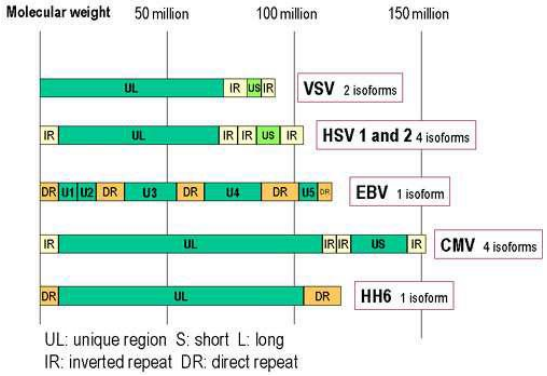


**Figura 6: Herpesvirus – organizzazione genomica**

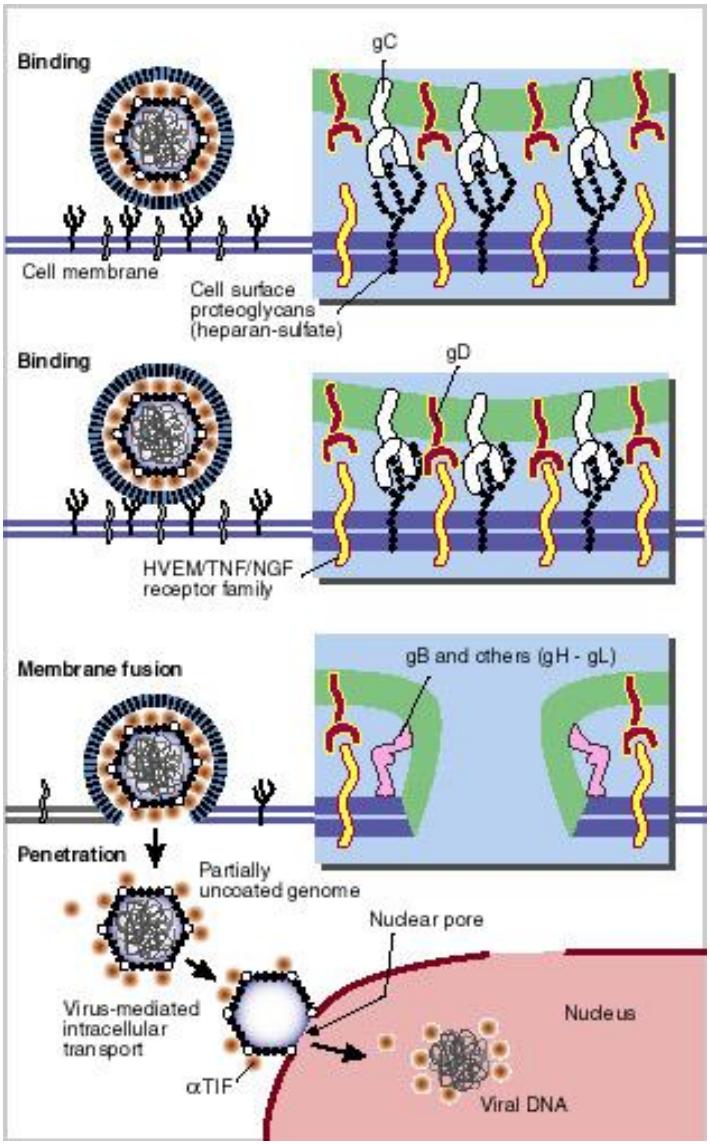


**Figura 7: Meccanismo di internalizzazione nella cellula ospite**

Dopo aver infettato la cellula, il virus deve prendere un importante decisione tra procedere con un infezione produttiva o instaurare un infezione latente. Il DNA virale che entra attraverso i pori nucleari può circolarizzarsi nel DNA cellulare grazie ad enzimi “cellular DNA repair” che agiscono su "a" sequences o rimaner lineare grazie all’azione di un IE proteina ICP0, che inibisce “cellular DNA repair”. In ogni caso la latenza si instaura al termine della replicazione riproduttiva, caratterizzata da una reazione a cascata.

La prima fase consiste nell’espressione di geni "immediate-early" essenziali per avviare la trascrizione virale. Immediatamente dopo c’è l’espressione di geni "early" (β) fase; ed infine, dopo la replicazione virale una grande quantità di proteine strutturali viene espressa nella fase "late" (βγ/γ) fase.

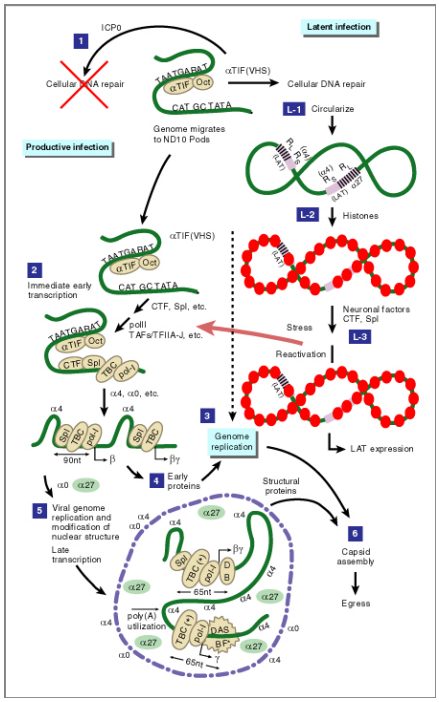


**Figura 8: Infezione produttiva / infezione latente**

Il capside maturo attraversa la membrana nucleare tramite un doppio invaginamento della stessa nel quale lega temporaneamente glicoproteine. Il capside all'interno del nucleo è circondato da un primario tegumento proteico. Questo primario tegumento attraversando la membrana nucleare è perso. Il capside citoplasmatico è associato a numerose proteine del tegumento come a-TIF e vhs, fondamentali per la costituzione dell'envelope. Esso si forma dalla membrana della vescicola di esocitosi, che contiene tutte le glicoproteine ad esso associate.

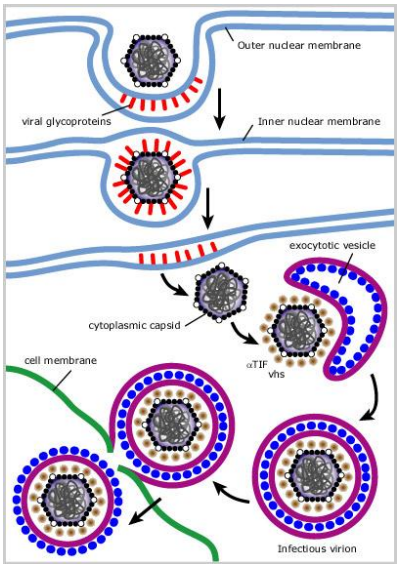


**Figura 9: Replicazione virale**

La caratteristica peculiare di questa famiglia è la possibilità di latentizzare, inseguito all'infezione primaria. A distanza di tempo l'infezione si può riattivare (infezione ricorrente) con patologie che possono essere anche differenti dall'infezione primaria. Le infezioni sono spesso asintomatiche ma possono assumere decorso molto sfavorevole in individui immunocompromessi. I virus erpetici inducono o possono indurre infezioni latenti così come i Papovavirus, Hepadnavirus e naturalmente i Retrovirus.

Esempio tipico di latenza è l'herpesvirus di tipo 1 che, a seguito dell'infezione primaria, va a localizzarsi trasportato lungo l'assone del nervo sensitivo al ganglio sensorio regionale, soprattutto nei gangli del trigemino.

Il virus infetta i neuroni e persiste in essi nel nucleo in più copie e in forma episomiale stabilendo una infezione latente che dura tutta la vita. Stimoli poco conosciuti, clinicamente legati ad eventi patogeni e di stress, attivano il virus latente che si moltiplica nei neuroni e viene trasmesso attraverso il plasmalemma della fibra nervosa sensitiva fino alle giunzioni neuroepiteliali con conseguente infezione delle cellule sovrastanti epiteliali e produzione della lesione erpetica.

Durante la latenza del virus non sono state messe in evidenza proteine virali nei neuroni.

Tipico esempio è il virus di Epstein Barr (EBV), un altro virus erpetico, agente della mononucleosi infettiva. Esso si moltiplica nelle cellule epiteliali naso faringee e infetta i linfociti B stabilendo in essi un'infezione latente in forma episomiale (più copie di DNA circolarizzato nel nucleo). Nelle cellule tumorali del linfoma di Burkitt è stato individuato genoma integrato.

La latenza di EBV nei linfociti B non è completamente silente. Il genoma virale esprime alcune proteine, i così detti antigeni nucleari (EBNA) dei quali è stato particolarmente studiato EBNA-1 che induce la DNA polimerasi cellulare a produrre più copie di DNA episomiale virale. Altri EBNA inducono l'immortalizzazione dei linfociti B mentre altri antigeni virali prodotti, i così detti antigeni di membrana che compaiono sulla superficie della cellula infetta, stimolano una risposta cellulo mediata nei confronti del linfocita B infetto (quindi aumento dei Linfociti T nel corso della mononucleosi infettiva).

RESISTENZA AGLI AGENTI FISICO-CHIMICI – Gli herpesvirus sono sensibili a etere e cloroformio e parzialmente alla tripsina e lipasi pancreatica. L'infettività è distrutta al calore per 10 minuti a 56°C, 80-100 minuti a 50°C o 30 giorni a 22°C. L'essiccamento a 22°C riduce la sopravvivenza a 9 giorni. A pH 7-9 non si ha perdita di titolo, mentre a pH 3 e 11 il virus è rapidamente inattivato

# LARINGOTRACHEITE INFETTIVA AVIARIA

## STORIA E DIFFUSIONE

Descritta per la prima volta nel 1923 in USA, solo nel 1964 è stato segnalato il primo focolaio in Italia. Soltanto negli anni 80 la malattia da ceppi virulenti si è diffusa per la prima volta, con andamento epizootico, prima nei Paesi nord europei e poi in Italia, provocando gravi danni. È stata diagnosticata in tutto il mondo.

## EZIOLOGIA

L'agente causale è Gallid herpesvirus 1. La biologia molecolare del virus ha permesso di identificare nel DNA 21 geni, che presentano molte omologie con quelli degli altri alphaherpesvirus, soprattutto dell'Herpes simplex (HSV). Particolare attenzione è stata rivolta ai geni che codificano le glicoproteine dell'envelope, perché queste molecole sono le principali responsabili della stimolazione della risposta immunitaria umorale e cellulomediata. Le cinque maggiori glicoproteine, individuate mediante immunodiffusione, sono state divise, usando gli anticorpi monoclonali, in due gruppi; il gruppo 205, comprendente gp 205, 160, 115, 90 kDa, che costituiscono il complesso glicoproteico B (gB) con forte capacità immunostimolante e che presenta omologie con quelle degli altri Herpesvirus. Un gene, che si colloca nella regione US, codifica invece gp60, specifica di ILTV, il cui ruolo nell'immunità e nella patogenesi non è stato ancora determinato.

Nel terreno di coltura di cellule infettate con ILT è stata riscontrata inoltre la gpX (gX) non strutturale, facente parte della famiglia glicoproteica espressa dal gene G, omologa a quella individuata nelle colture del virus della Malattia di Aujeszky, con proprietà immunogena. Tuttavia i tentativi di vaccinazione con la proteina di fusione gpX non hanno protetto da ILTV, né dalla replicazione virale.

Il virus presenta una notevole uniformità antigenica, dimostrando di appartenere ad un unico sierotipo con la VN. Tuttavia lo studio del genoma dei vari ceppi con gli enzimi di restrizione ha evidenziato differenze significative, particolarmente nel segmento US, che sembrano promettenti per la differenziazione dei ceppi vaccinali e di campo e che possono giustificare la variabilità di altre caratteristiche, come la resistenza agli agenti fisico-chimici, la virulenza e il tropismo per determinati organi.

ILTV è relativamente labile agli agenti ambientali (44h a 37°C) e molto sensibile agli agenti lipolitici, al calore (15 minuti a 55°C), alla luce solare e ai disinfettanti, che in gran parte lo inattivano entro un minuto.

Il virus replica sulla CAM d'uovo embrionato di pollo con formazione di placche e su colture cellulari primarie di CEL e CEK o di rene di pollo con effetto citopatico e formazione di sincizi. Nelle cellule infette compaiono, già dopo la 12° ora dall'infezione, inclusi nucleari e vescicole citoplasmatiche.

SPETTRO D'OSPITE - Il principale ospite naturale è il pollo; solo occasionalmente la malattia è stata descritta nel fagiano e nel pavone. Gli uccelli selvatici sono risultati refrattari. Il pulcino nei primi 20 giorni di vita non è risultato sensibile all'infezione, indipendentemente dalla presenza o meno d'anticorpi materni, mentre la remissione della sintomatologia si ha tra i 7 e i 28 giorni post infezione, normalmente tra i 10 e i 14 giorni.

TRASMISSIONE - Normalmente avviene la trasmissione diretta da capo a capo per inalazione o per via congiuntivale. L'infezione di un gruppo sensibile molto spesso avviene per l'introduzione di nuovi capi, portatori sani o con infezione persistente. Negli allevamenti intensivi solitamente dopo le epizoozie di ILT acuta con mortalità del 20% o più, la malattia rimane in forma benigna, ben controllata dalle pratiche vaccinali tradizionali. Rimane, tuttavia, sempre il pericolo della circolazione e rivirulentazione dei ceppi vaccinali. Diversa è la situazione negli allevamenti rurali, dove per la discontinuità o l'assenza di vaccinazioni persistono le infezioni endemiche di virus a varia virulenza. Essi quindi costituiscono un'importante riserva di virus patogeno.

Recentemente è stata rivalutata la trasmissione indiretta passiva con attrezzature contaminate e personale, giacché si è costatato che il virus nel muco essiccato e nelle carcasse è meno sensibile di quanto si pensasse. Resiste, infatti, per 21-80 giorni con temperature ambientali fino a 20°C, se protetto dalla luce solare. Nelle feci fresche di polli in batteria resiste per 3 giorni, mentre nella lettiera profonda può sopravvivere per 20 giorni. In conseguenza lo smaltimento delle carcasse e della pollina e il controllo degli infestanti (roditori, insetti e uccelli) nei luoghi di produzione assumono valore prioritario.

La trasmissione verticale non è mai stata dimostrata.

PATOGENESI

La malattia naturale è confinata all'apparato respiratorio con viremia assente o transitoria. Le cellule epiteliali della laringe e della trachea sono il bersaglio del virus, benché sia ammesso che in casi sporadici possa replicare nella mucosa cloacale, nei follicoli delle penne, nel timo, nella borsa di Fabrizio e nel fegato. Dopo l'infezione, il reisolamento del virus dalla trachea non è più possibile dopo 10 giorni. La ricomparsa del virus dopo almeno tre mesi dimostra che il blocco della replicazione è causato da processi immunitari,

soprattutto d'immunità cellulo mediata, e che il mancato isolamento non corrisponde alla scomparsa del virus, ma al suo passaggio in latenza.

Durante la fase acuta della malattia, anche ILTV migra regolarmente per via neurale verso il ganglio trigemino e i gangli tracheali periferici, com'era stato osservato per altri alphaherpesvirus, come l'HSV. Qui, si ha l'integrazione del DNA virale in quello cellulare e il contemporaneo mantenimento di molte copie di DNA virale ad anello nel nucleo in posizione extracromosomiale. La trascrizione di questi genomi è contenuta al minimo dai meccanismi immunitari, che esercitano un importante livello di controllo, pur non riuscendo ad ottenere la clearance. Tutti i ceppi di campo e vaccinali possono presentare la fase di latenza. Si ritiene che circa il 50% degli animali guariti o vaccinati rimanga portatore per almeno 16 mesi. Dopo circa tre mesi dall'infezione e per tutta la vita dell'animale avviene una sporadica riattivazione del virus, facilitata da particolari stress, come l'entrata in deposizione, il riaccasamento o l'immissione nel gruppo di soggetti estranei. È confermato che la riattivazione del virus in trachea parte dal ganglio trigemino, dove il virus vaccinale è stato individuato, tramite PCR, anche dopo 15 mesi dalla vaccinazione. Le ricerche più recenti sulla Malattia di Aujeszky, anch'essa dovuta ad un alphaherpesvirus, hanno svelato che la glicoproteina I (gI) è essenziale per la localizzazione nei gangli nervosi e quindi per la latenza e la timidina chinasi (TK) per la riattivazione del virus nei neuroni. Un processo identico è stato dimostrato per la riattivazione di ILTV (figura 2).

## CARATTERI DELLA MALATTIA

SINTOMI – Le forme cliniche possono presentarsi in forma iperacuta, subacuto o lieve, a seconda della virulenza dei ceppi coinvolti, della dose infettante, dell'età degli animali e della presenza di fattori stressanti.

**Figura 10: Sintomatologia clinica**

Nella forma acuta dopo 6-12 giorni dall'infezione naturale si notano scuotimento della testa, rantoli, inspirazione a becco aperto e collo disteso, congiuntivite e lacrimazione in rapida diffusione. La morbilità oscilla tra 50-80% e la mortalità tra 4-35% (media 6-7%) in gran parte per soffocamento. Frequenti sono le emissioni a getto di muco e sangue dalla bocca, che imbrattano i muri periferici del ricovero. Brusca è la caduta della deposizione che, a differenza di quanto avviene in caso di Bronchite infettiva, non è associata al deterioramento della qualità dell'uovo e rientra nella norma in tempi più brevi, usualmente entro 15-20 giorni. In qualche capo si può riscontrare una cecità completa temporanea. Il decorso della malattia è di circa 15 giorni.

**Figura 11: Espettorato muco-purulento**

**Figura 12: Congiuntivite**

Nella forma subacuta i sintomi caratteristici principalmente osservati sono un abbattimento generale degli individui coinvolti, la riduzione del consumo di acqua ed alimento, la presenza di scolo nasale, rantoli seguiti da tosse e respiro affannoso, dispnea accentuata ed emissione di muco sanguinolento, occhi umidi, congiuntivite, tumefazione dei seni

infraorbitali. La maggioranza dei soggetti giunge a guarigione in 7-10 giorni, la mortalità può variare dal 10 al 30%.

**Figura 13: Abbattimento**

La forma lieve è caratterizzata da un mortalità bassa, inferiore al 5%, e si manifesta con lieve scolo nasale, congiuntivite, lacrimazione e presenza di membrane difteriche o essudato mucoso in trachea.

**Figura 14: Tumefazione seni infraorbitalia**

Per valutare la forma in cui la patologia si presenta, viene utilizzato il “Clinical Score”, che si applica attribuendo un punteggio da 1 a 4 quando più del 50% degli animali manifestano sintomatologia clinica:

1. Leggermente malati: occasionalmente tosse, rantoli, starnuti. Buone condizioni generali
2. Malati: segni respiratori permanenti, rinite, congiuntivite, tracheite non emorragica, dispnea, depressione
3. Gravemente malati: grave dispnea, respirazione affannosa, tracheite emorragica, emissione di muco macchiato di sangue, congiuntivite, depressione mortalità <10%
4. Elevata mortalità: segni clinici uguali al punto 3 e mortalità >10%

**Figura 15: Dispnea**

LESIONI - La lesione più caratteristica e comune della forma iperacuta è la laringotracheite catarrale, emorragica, necrotica. Tappi caseosi e coaguli in laringe e trachea, congiuntivite e sinusite sono frequenti. Meno frequentemente sono interessati i bronchi, i polmoni e i sacchi aerei.

**Figura 16: Sezione longitudinale trachea**

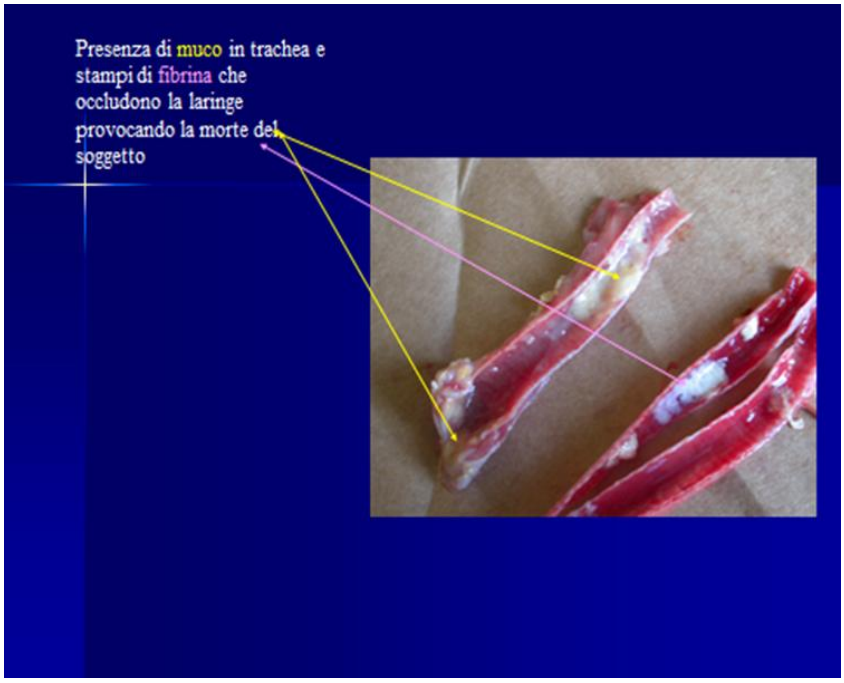


**Figura 17: Trachea occlusa da fibrina**

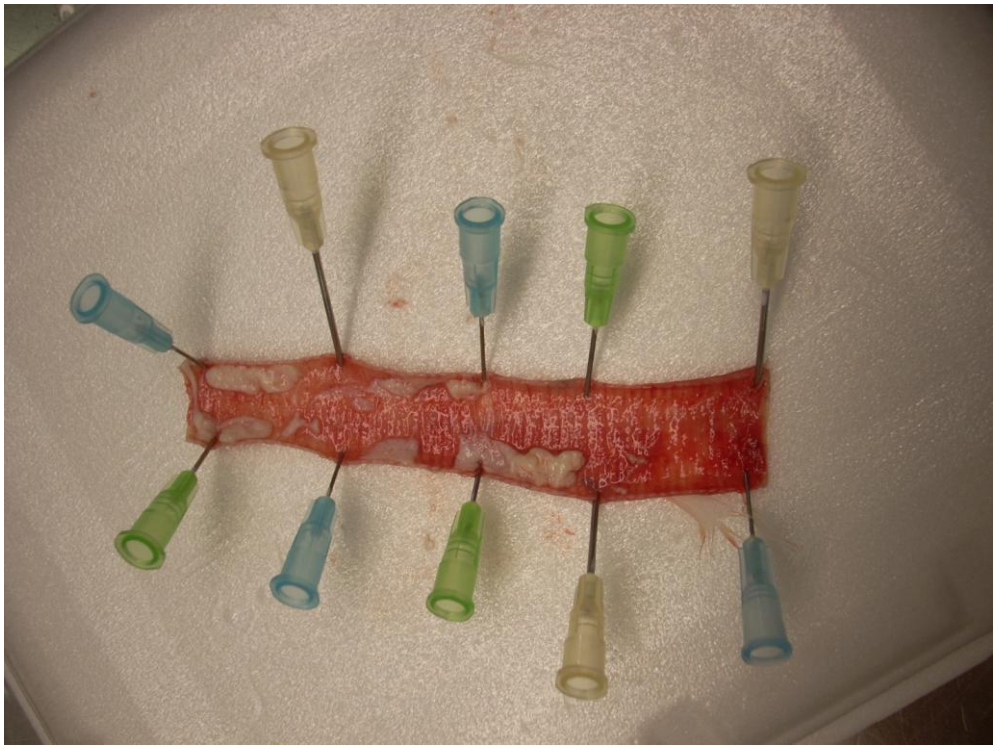

**Figura 18: Trachea**

Istologicamente si evidenziano degenerazione e necrosi delle cellule epiteliali della mucosa tracheale e della laringe, emorragie, edema e infiltrazione cellulare infiammatoria di

linfociti, macrofagi, eterofili e plasmacellule nella mucosa e sottomucosa. Si rilevano inoltre gli inclusi endonucleari acidofili.

## IMMUNOLOGIA

La risposta immunitaria del pollo all'infezione da ILTV di campo o vaccinale, inizialmente di tipo aspecifico con un importante ruolo dell'interferone nei primi 3-4 giorni, a partire dal 6-7° giorno diventa specifica, sia umorale, sia cellulo mediata. Ben noti sono gli anticorpi virus neutralizzanti nel siero e le IgG e IgA mucosali in trachea. Recenti ricerche hanno dimostrato, che entrambi non sono essenziali per impedire la replicazione del virus e che la protezione da ILT si basa prevalentemente sulla risposta immunitaria cellulo mediata locale. Tuttavia il decorso della malattia è risultato sensibilmente aggravato da infezioni con effetto soppressivo della produzione di anticorpi, come la malattia di Gumboro e la reticoloendoteliosi bursale.

La vaccinazione stimola alti livelli di protezione per 15-20 settimane. Questi studi hanno dimostrato, inoltre, un rapporto inverso tra livello di latenza del virus attenuato e quello del virus selvaggio. Quindi un buon virus vaccinale deve passare facilmente e rapidamente in latenza per competere con la latenza del virus di campo.

## DIAGNOSI

Sui dati anamnestici, i sintomi e le lesioni, si può formulare una diagnosi presuntiva attendibile. La conferma si otterrà con l'isolamento del virus da essudato tracheale su CAM d'uovo embrionato di pollo e su monostrati di CEL o CEK, e l'identificazione con IF e ME. Sulle cellule infette sono state sperimentate con successo anche le sonde nucleari abbinate o no alla PCR.

Il prelievo dell'inoculo, costituito da trachea o essudato tracheale, dovrà essere effettuato da soggetti vivi, infetti da meno di sette giorni.

Nella ricerca virologica diretta su trachea o su tamponi tracheali, IP e IFI hanno mostrato una buona specificità e sensibilità. Sul raschiato tracheale, un metodo acELISA con anticorpi monoclonali si è dimostrato più rapido e altrettanto attendibile dell'isolamento e molto più sensibile delle altre prove dirette. Innegabile vantaggio della PCR è nella possibilità di individuare il virus in campioni pesantemente contaminati da batteri o da altri virus, che potrebbero interferire nelle prove d'isolamento. A questo proposito va tenuta sempre presente la frequente associazione ILTV col virus del vaiolo. La PCR può essere utile anche su tamponi congiuntivali, preferibili ai tracheali perché meno contaminati e con maggiore quantità di virus, in caso di prelievi tardivi, solitamente negativi all'isolamento, dopo il 7° giorno p.i.

La diagnostica sierologica ha scarso valore in quanto le prove di ID, VN e ELISA rimangono spesso negative dopo la vaccinazione e diventano positive solo in una parte dei capi dopo l'infezione. Inoltre si è costatata la mancata corrispondenza tra titolo anticorpale e protezione. Ultimamente, il sistema ELISA si è imposto sulle altre metodiche per la maggiore praticità e sensibilità e per i risultati molto vicini a quelli ottenuti con la VN.

PROFILASSI

DIRETTA SANITARIA - Spopolamento e sanificazione degli ambienti e attrezzature sono alla base della profilassi diretta. La ricontaminazione per via indiretta è evitabile adottando le comuni norme di biosicurezza. Più facile è la ricomparsa dell'infezione con l'introduzione di polli apparentemente sani, ma portatori di virus da strada in fase latente. In tal caso gli acquisti e l'immissione di nuovi soggetti in allevamento devono essere fatti con estrema oculatezza e possibilmente vanno evitati.

INDIRETTA VACCINALE - ILT è stata la prima malattia virale aviaria controllata per mezzo della vaccinazione con l'uso di vaccini vivi attenuati. I ceppi dei vaccini in commercio sono stati attenuati con ripetuti passaggi su embrione di pollo o colture cellulari.

La dose vaccinale consigliata è 105 DIE50. La vaccinazione intraoculare, in un solo occhio, dopo il mese d'età, ripetuta prima della deposizione, è il metodo migliore da consigliare. La via maggiormente usata, per i vantaggi di praticità e rapidità nei trattamenti di massa, è l'acqua da bere, ma è da sconsigliare per la difformità d'immunizzazione e il pericolo della rivirulentazione del ceppo vaccinale. Risultati migliori si otterrebbero con il metodo spray, ma si corre il rischio di forti reazioni postvaccinali ed è perciò consigliato solo come seconda vaccinazione.

La contemporanea vaccinazione contro la Malattia di Newcastle interferisce con la risposta al vaccino per ILT ed è quindi sconsigliabile.

ERADICAZIONE - Alla luce di nuove conoscenze dovute alla biologia molecolare, pur riconoscendo i grandi benefici ottenuti dai vaccini tradizionali, sorge la domanda se sia proponibile l'eradicazione di ILT dagli allevamenti intensivi di pollo.

I ceppi vivi attenuati dei vaccini tradizionali, la cui validità è fuori discussione, conservano una patogenicità residua e sono in grado di passare dai polli vaccinati ai non vaccinati col pericolo di una rivirulentazione o ricombinazione con virus virulenti. La latenza e la sporadica riattivazione e disseminazione del virus vaccinale costituiscono ulteriori complicazioni. La vaccinazione, così com'è stata praticata finora, non è quindi compatibile con l'eradicazione.

Solo l'ingegneria genetica è in grado di costruire vaccini utili all'eradicazione, basati su vettori di subunità di ILTV oppure su ILTV ricombinante. Il complesso 205, componente

della gB, è risultato pienamente efficace se inserito, come geni, nel virus vaccinale del Vaiolo, in MDVo HVT e in adenovirus. Con questi vaccini si potrebbe ottenere una popolazione di polli immuni, mai infettati, condizione ideale per l'eradicazione.

Seguendo quanto è stato fatto per la Malattia di Aujeszky, è stato segnalato che anche per ILTV è possibile inserire un marker al posto di un gene non essenziale (gX) per distinguere i ceppi vaccinali da quelli di campo e costruire ceppi deleti per timidina chinasi, TK-, incapaci quindi di riattivarsi e di riorganizzarsi in vivo con i ceppi di strada, una volta passati in latenza.

Le premesse per tendere all'eradicazione, quindi, esistono e si conoscono anche i probabili tempi d'attuazione. L'unico freno deriva dal calcolo del rapporto costo-beneficio e dalle considerazioni se è opportuno aggiungere ILT ad altre malattie aviarie, economicamente più importanti, come Malattia di Gumboro, Malattia di Newcastle, Malattia di Marek e Bronchite infettiva, per le quali si perseguono risultati tramite le biotecnologie.

Per il momento, nell'attesa dei nuovi vaccini, è consigliabile mantenere l'immunità vaccinale in tutti i polli adulti, riproduttori e ovaiole, degli allevamenti intensivi, e anche rurali e amatoriali, qualora l'infezione sia diffusa, vaccinando a tappeto le pollastre. Riguardo al pollo da carne è invece sufficiente adottare rigorose norme di biosicurezza senza ricorrere alla vaccinazione.

# SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA

In Italia la situazione epidemiologica risulta sovrapponibile a quanto rilevato in altri paesi con alte concentrazioni avicole e produzioni intensive. Nel corso degli ultimi anni sono state evidenziate nel nostro paese forme respiratorie riferibili a laringotracheite soprattutto in allevamenti di broiler. Le aree coinvolte sono nelle regioni di Lombardia, Veneto, Emilia-Romagna, Puglia e Molise, dove si concentra la maggior parte di allevamenti di pollo da carne e di ovaiole.

Considerato che la maggior parte dei focolai verificatisi in allevamento di broiler è causata da virus indistinguibili dai virus vaccinali mediante RFLP, è stato deciso da diversi autori di definire queste nuove forme caratteristiche dei broiler con il nome di "Vaccine Laryngotracheitis" (VLT) (Doufour-Zavala, 2008). In diversi paesi la comparsa dei VLT negli allevamenti industriali di broiler è considerata uno dei problemi sanitari emergenti, responsabile di ingenti perdite economiche.

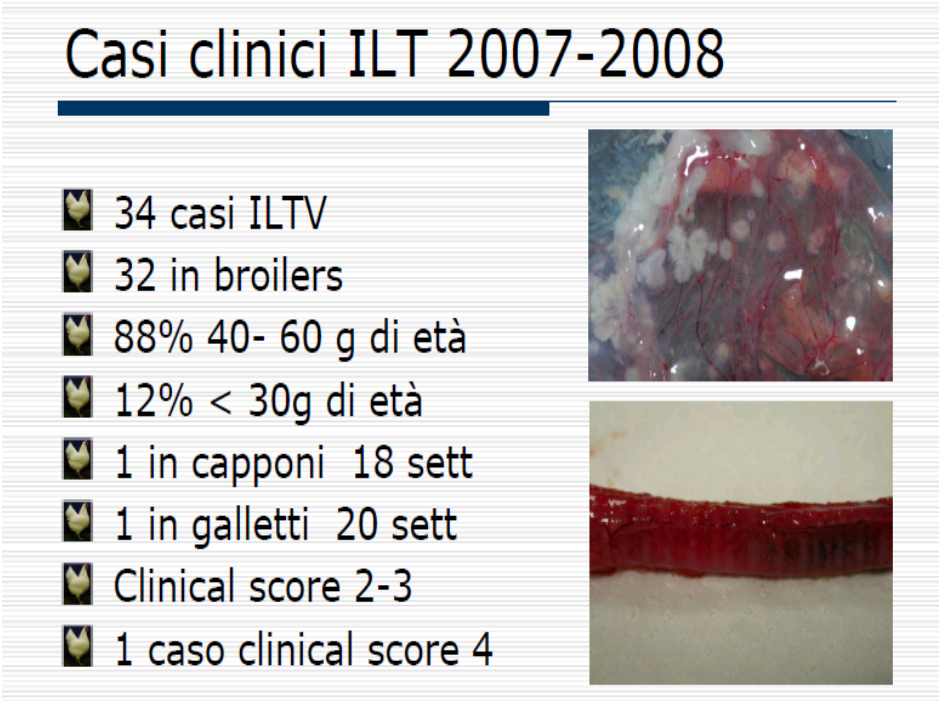


**Figura 19: Casi clinici ILTV in Italia anni 2007 e 2008**

I casi osservati nel nostro paese hanno riguardato fondamentalmente broiler sopra i 35 giorni di età e sono stati caratterizzati da sintomatologia delle prime vie respiratorie con tosse, dispnea, espettorazione di muco, fibrina e a volte sangue.

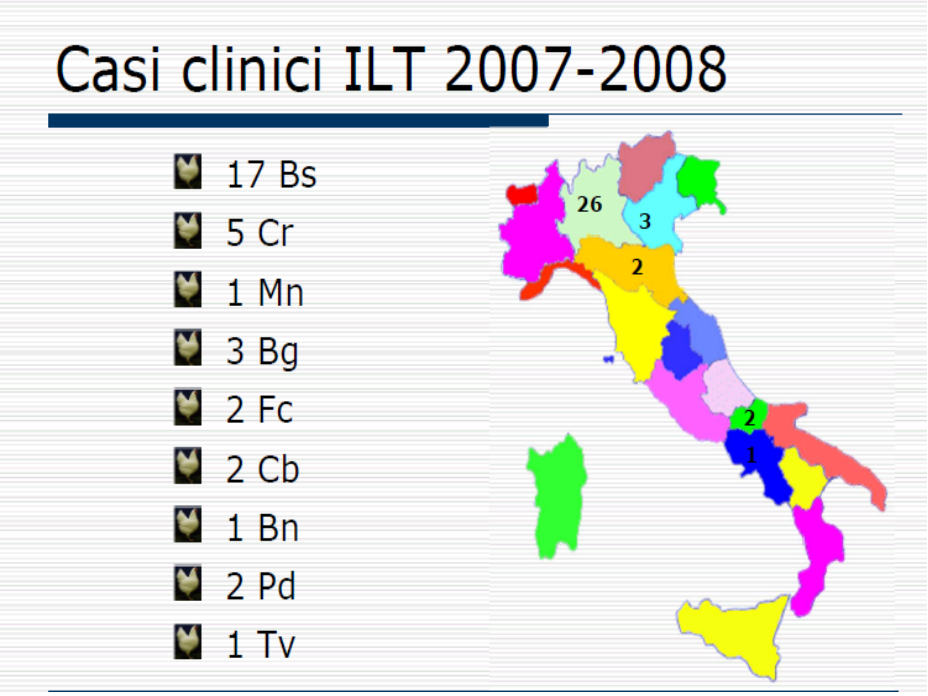


**Figura 20: Casi clinici ILTV in Italia anni 2007 e 2008 - diffusione geografica**

**Figura 21: Casi clinici ILTV in Italia anni 2009 e 2010**

Le lesioni macroscopiche più frequenti sono state edema e congestione dell'epitelio della congiuntiva, sinusite, tracheite di variabile entità con presenza di essudato mucoide o emorragico nei casi più gravi. La mortalità è variata da bassa (< 10%) a molto bassa (0,5-2%).

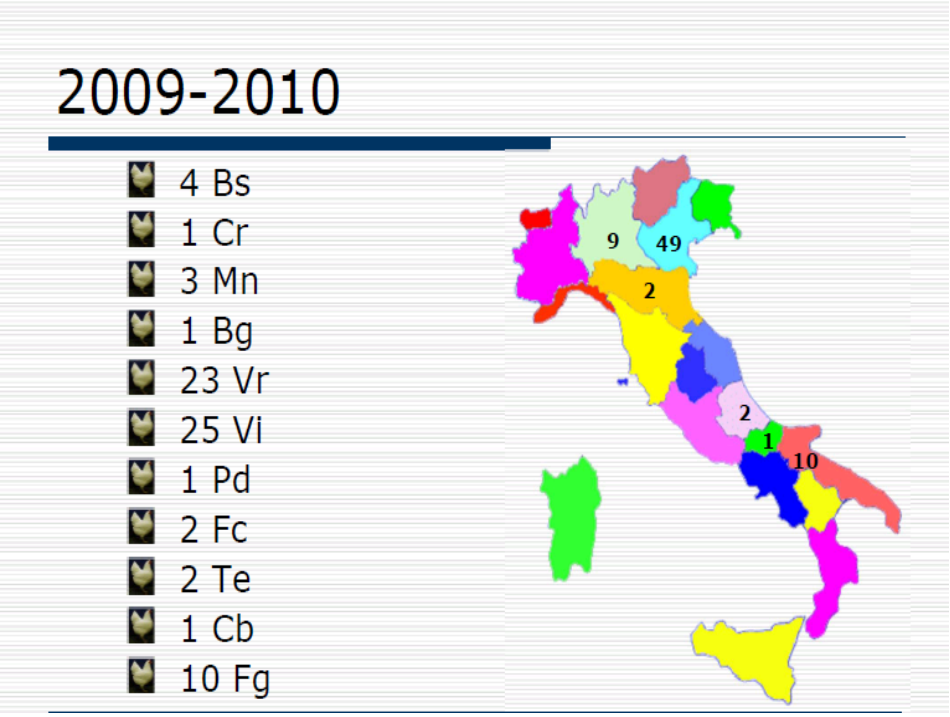


**Figura 22:Casi clinici ILTV in Italia anni 2009 e 2010 - diffusione geografica**

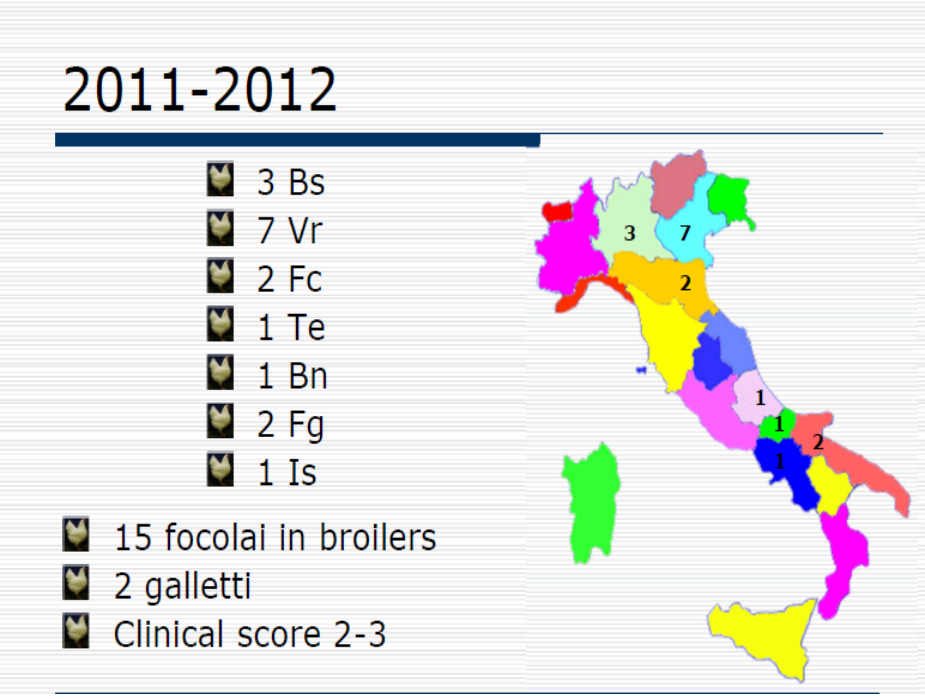


**Figura 23: Casi clinici ILTV in Italia anni 2011 e 2012 - diffusione geografica**

Comparando i dati riguardanti i casi clinici di ILTV nei bienni 2007-2008, 2009-2010 e 2011-2012 è possibile riscontrare delle analogie, sia dal punto di vista epidemiologico che dal punto di vista clinico.

I focolai in tutti e tre i bienni si sono manifestati nella maggioranza dei casi, rispettivamente nel 91,2%, 82,2% e 70,5% dei casi, nelle tre principali regioni ad elevata vocazione avicola. Le ragioni di questa elevata frequenza di casi di ILT in tali regioni sono sicuramente da ricercarsi nell'elevata concentrazione di allevamenti intensivi che occupano il territorio.

Come riportato nella descrizione generale di questa patologia gli animali più colpiti nell'arco dei 6 anni considerati sono stati principalmente i broiler, anche in questo caso, probabilmente, per la loro superiore consistenza numerica, e in particolare gli animali di età superiore ai 35 giorni.

I clinical score calcolati nei singoli focolai sono stati quasi esclusivamente di valere 2 e 3, raramente si è raggiunto un livello 4, confermando la presenza pressoché esclusiva di un virus a media patogenicità.

# STRATEGIE DI CONTROLLO

Il controllo della malattia si basa sull'applicazione di misure di biosicurezza e sulla vaccinazione con vaccini vivi attenuati CEO o TCO (Dufour-Zavala, 2008; Chin et al., 2009). Questi vaccini, soprattutto i vaccini vivi attenuati CEO, si sono mostrati particolarmente efficaci quando somministrati in modo corretto. Tuttavia, è stato dimostrato che questi vaccini, in particolare i vaccini CEO, possono riacquisire virulenza con il passaggio da animale ad animale, essere trasmessi da animali vaccinati ad animali non vaccinati e stabilire latenza in polli apparentemente in buono stato di salute. Per i polli da carne il controllo della malattia si basa quindi unicamente sull'applicazione scrupolosa delle misure di biosicurezza e di gestione dei focolai.

Allo scopo di stabilire delle misure di prevenzione e di definire un protocollo di gestione dei focolai, è stato creato nella regione Lombardia un gruppo di lavoro ad hoc che include le categorie professionali direttamente coinvolte. Questo gruppo ha il compito di discutere e sviluppare strategie di cooperazione, che coinvolgano anche l'industria, con l'obiettivo di definire le procedure e le misure di biosicurezza da applicare nella gestione dei focolai di ILTV.

Il fatto che le decisioni siano state prese collegialmente da tutte le figure coinvolte attraverso i loro rappresentanti, probabilmente renderà l'adozione delle misure previste più facilmente applicabile.

Il protocollo di intervento per il controllo della malattia e gestione dei focolai prevede le seguenti fasi:

1. Carico controllato
2. Pollina e morti
3. Pulizia e disinfezione
4. Vuoto sanitario
5. Controllo del personale di allevamento

1. Corico controllato: Consiste nella macellazione degli animali sani presenti in allevamento. Il carico degli animali dovrebbe essere predisposto come ultimo ritiro della giornata. Inoltre il capannone interessato dalla malattia dovrebbe essere tenuto in osservazione fino ala remissione della sintomatologia e successivo avvio alla macellazione.

2. Pollina e gestione dei morti: Invio dei morti a un'azienda autorizzata alla fine dell'episodio e dopo la macellazione degli animali una volta ristabiliti. Stoccaggio della pollina in ricoveri adeguati in area di proprietà dell'allevatore.

3. Pulizia e disinfezione: Lavaggio e successiva disinfezione e rispetto di un vuoto sanitario di almeno 21 giorni.

4. Controllo del personale di allevamento: In particolare il personale a contatto con gli animali, compreso quello impegnato nel ritiro, dovrà essere dotato di indumenti protettivi, tute e stivali. Un ulteriore accorgimento sarebbe quello di evitare di chiamare personale per la gestione di muletti o pale meccaniche, ma se possibile preferire la gestione interna. Tutto il personale a contatto con gli animali, inoltre, dovrebbe evitare il contatto con altri allevamenti.

L'introduzione di animali apparentemente sani ma portatori di virus di campo in fase latente costituisce uno dei punti critici per l'introduzione dell'infezione in allevamento. Si raccomanda pertanto particolare attenzione nell'acquisto e immissione di nuovi soggetti in allevamento, operazione che dovrebbe essere fatta con estrema oculatezza o, quando possibile, evitata.

Il monitoraggio e la rapida diagnosi di tutte le forme cliniche respiratorie è un altro aspetto da non sottovalutare. La rapida identificazione dei casi di ILTV, la tempestiva applicazione di tutte le misure di controllo e di gestione dei focolai e infine l'immediata segnalazione rimangono punti cardine per il controllo della diffusione della malattia.

# ASPETTI PRATICI NELLA PREVENZIONE E NEL CONTROLLO DI ILTV

I passi fondamentali nel controllo di ILTV sono un programma di prevenzione sostenuto sia ufficialmente dalle Autorità Sanitarie sia dall'industria di filiera che abbini, a livello regionale, l'esecuzione di controlli, alle migliori pratiche di biosicurezza e all'implementazione di programmi di vaccinazione efficaci e sicuri. Queste misure, seguite da un piano di sorveglianza epidemiologica attiva e da un supporto diagnostico rapido e preciso faciliterà l'individuazione precoce dei focolai di ILT. I mercati avicoli e i volatili da cortile dovrebbero essere inclusi nel piano.

Per contenere un focolaio di ILT e il relativo impatto economico si deve mettere in atto un chiaro e dettagliato piano di emergenza progettato per integrare e coordinare interventi a più livelli della filiera avicola. Per raggiungere l'eradicazione regionale della Laringotracheite Infettiva è necessario un impegno continuo, sistematico, armonizzato e inserito a diversi livelli della catena produttiva.

La cooperazione e la comunicazione aperta tra Autorità, laboratori diagnostici, Università, organizzazioni, filiere e singole aziende, oltre che al personale di allevamento, sono componenti essenziali di un'azione integrata e prolungata per contenere una epidemia di ILT e per avere le migliori possibilità di controllo della malattia in una regione in prospettiva di una futura eradicazione.

Parte del programma dovrebbe essere riservato ad una campagna formativa di base per capire a fondo la natura altamente infettiva della ILTV e delle gravi implicazioni economiche della stessa dal momento della sua comparsa in allevamento o quando è endemica in una regione. E' inoltre fondamentale nella progettazione delle misure di controllo, migliorare i livelli di biosicurezza e verificarli nel tempo. Il successo della strategia sarà condizionato dal grado di coinvolgimento dei partecipanti.

E' necessario che il programma di controllo della ILT sia ben finanziato per avviare presso gli allevatori avicoli di una data regione una campagna di verifica delle migliori pratiche di biosicurezza e un piano di sorveglianza epidemiologica attiva focalizzato sui punti critici di controllo quali gli impianti di macellazione e laboratori diagnostici. Tale programma dovrebbe anche prevedere indennizzi per gli allevatori.

La realizzazione e il miglioramento di barriere fisiche, chimiche e biologiche negli allevamenti a rischio, l'uso di misure di rigorosa biosicurezza e l'immunizzazione uniforme dei gruppi sono passaggi cruciali della profilassi diretta. E' inoltre fondamentale nelle aziende a rischio una rivalutazione costante delle pratiche riguardanti le misure di biosicurezza e la verifica sistematica della loro attuazione, focalizzandosi soprattutto sullo spostamento del pollame, i metodi di smaltimento, la circolazione di persone, attrezzature e

veicoli in allevamento. Nelle strategie di controllo integrato della malattia si deve considerare l'esistenza di serbatoi del virus in gruppi di animali da cortile, volatili selvatici e ornamentali.

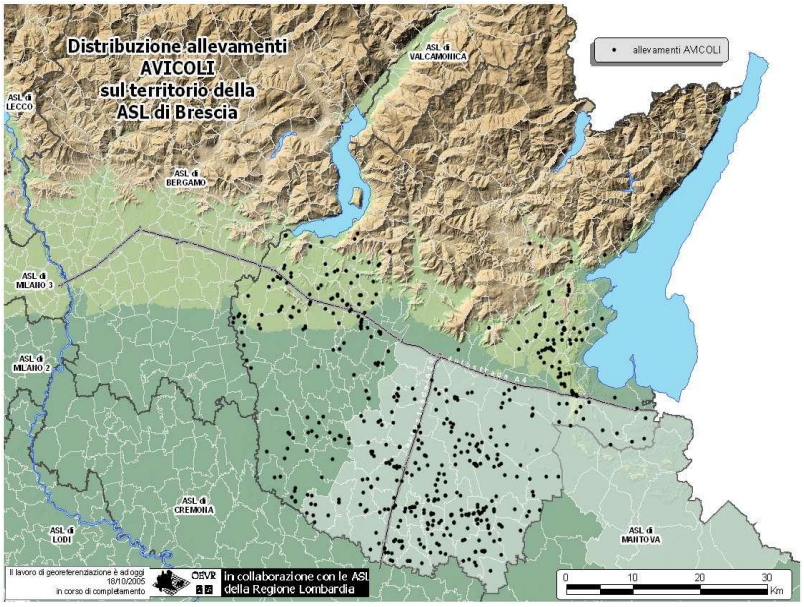


**Figura 24: Geolocalizzazione allevamenti avicoli, territorio ASL Brescia**

Sarà molto utile nella progettazione del programma di prevenzione, monitoraggio e controllo della ILT individuare, mappare e geolocalizzare correttamente tutti gli allevamenti avicoli commerciali e gruppi di animali da cortile di una determinata regione avicola, includendo le vie di trasporto e la viabilità alternativa.

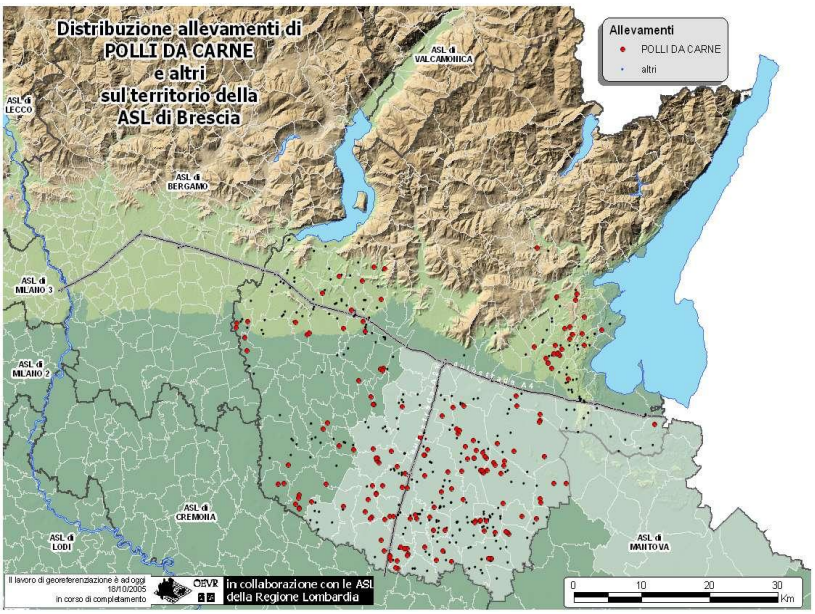


**Figura 25: Geolocalizzazione allevamenti broiler, territorio ASL Brescia**

Altro punto fondamentale nella lotta alla ILT, così come verso altre patologie rilevanti per il settore avicolo, è il corretto funzionamento e il costante aggiornamento della Banca Dati Nazionale, così da permettere a tutti i soggetti in campo nella lotta contro questo virus di avere un quadro realistico, complessivo e sempre aggiornato della situazione del settore avicolo nazionale. Inoltre questo permetterebbe la corretta identificazione delle misure da intraprendere su larga scala in tutto il territorio nazionale.

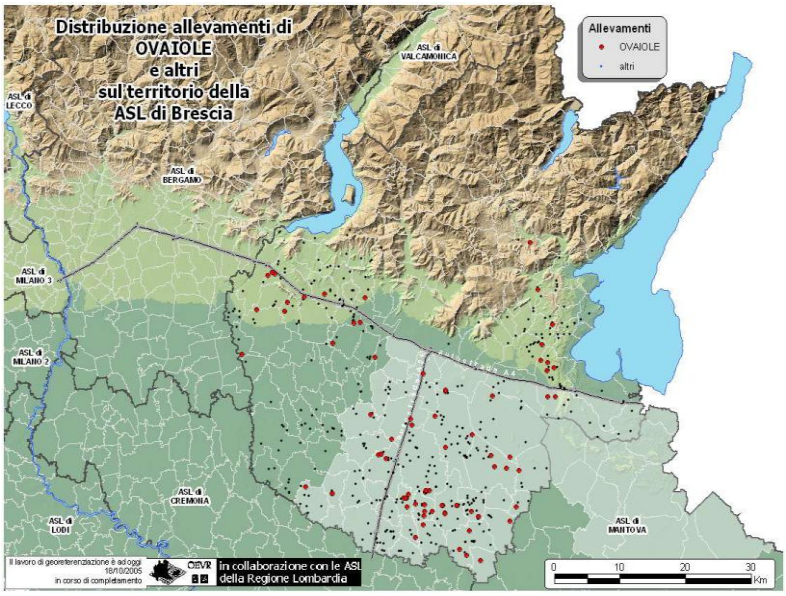


**Figura 26: Geolocalizzazione allevamenti ovaiole, territorio ASL Brescia**

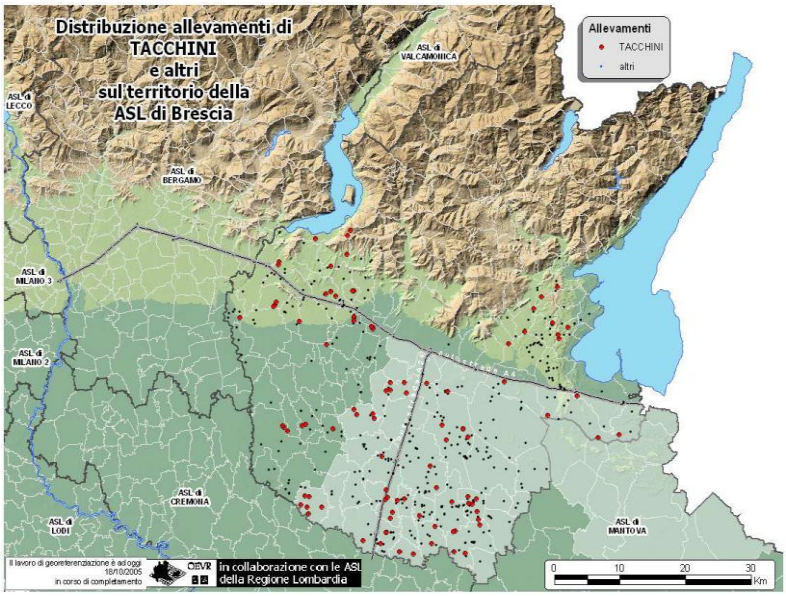


**Figura 27: Geolocalizzazione allevamenti tacchini, territorio ASL Brescia**

Quarantena

Negli allevamenti colpiti da ILT si deve esigere l'applicazione di un periodo di quarantena e devono essere aumentate le misure di biosicurezza. Inoltre, è opportuno, ridurre al minimo lo stress dei volatili colpiti per evitare un improvviso aumento di mortalità e per abbreviare il periodo di recupero. Si deve anche tener presente che gli animali dei gruppi infetti con ILT saranno eliminatori intermittenti di virus (si stima fino al 26 % di un gruppo infetto) in grado variabile a seconda delle condizioni ambientali. Questi periodi ciclici di emissione intermittente possono durare fino a 3 settimane.

La pulizia e disinfezione dei capannoni avicoli e degli allevamenti, soprattutto dove sono tenuti i gruppi infetti o vaccinati con vaccini convenzionali, dovrà essere accurata e approfondita e avvalersi dell'uso di disinfettanti (approvati ed efficaci). Il ILTV è sensibile alla maggior parte dei disinfettanti ed alle alte temperature. Le alte temperature e l'estensione del periodo di vuoto sanitario sono fattori importanti nella prevenzione della malattia.

Gestione focolaio

Gli interventi a più livelli, regionale e/o nelle aziende a rischio, devono essere chiaramente determinati in anticipo per evitare la diffusione della malattia. La complessità della gestione di un focolaio da ILT non facilita la definizione in anticipo di un piano di emergenza chiaro e dettagliato. E' fondamentale la trasparenza nella segnalazione dei focolai in campo e un facile accesso ad un supporto diagnostico di laboratorio rapido ed accurato per la diagnosi precoce di ILT. E' necessario disporre di canali di comunicazione semplici e accessibili per attivare il piano di emergenza. La raccolta di queste informazioni faciliterà la creazione della zona di contenimento e di percorsi a basso rischio per la mobilitazione del pollame e dei suoi sottoprodotti.

Le persone a contatto con gli animali infetti e/o gli impianti contaminati possono essere vettori meccanici del virus attraverso le mani, vestiti e scarpe. I volatili infetti da ILTV possono iniziare la diffusione del virus durante la prima fase del periodo di incubazione senza mostrare segni clinici della malattia. Per questa ragione, è importante mantenere i pediluvi in punti critici di controllo dei capannoni avicoli così come utilizzare regolarmente stivali e tute pulite, cuffie, mascherine, disinfettanti per le mani, devono essere sempre disponibili nelle strutture avicole. Gli operatori degli allevamenti avicoli non dovrebbero avere pollame da cortile a casa e devono in ogni caso evitare il contatto con esse.

I flussi dei movimenti tra capannoni avicoli dello stesso allevamento dovrebbe essere chiaramente stabili (dai gruppi giovani a quelli più vecchi, dai non vaccinati con ILTV a quelli vaccinati, dai sani ai malati) così come deve essere verificato e programmato in anticipo il movimento tra aziende agricole. Gli allevamenti dovrebbero avere zone sporche e pulite distinte, provviste di docce, per creare una barriera precauzionale e ridurre al minimo

l’entrata del virus. La rimozione, o compostaggio, e il successivo smaltimento della lettiera di gruppi infetti o vaccinati dovrebbe essere ben pianificata all’interno del capannone. Per ridurre al minimo la pulvirulenza durante questo processo si consiglia di bagnare la lettiera. La frequenza di raccolta dei morti ed il metodo del loro smaltimento (incenerimento, seppellimento, rendering o compostaggio) permettono di ridurre la diffusione della malattia evitando il contatto diretto con volatili sensibili o la trasmissione indiretta tramite insetti o roditori che si nutrono sulle carcasse.

I sintomi come una diminuzione nel consumo di cibo od acqua, una lieve blefarocongiuntivite (occhio di noce) con lacrimazione schiumosa uni- o bi-laterale possono permettere a manager di allevamento esperti di individuare precocemente un caso di ILT nel gruppo e confermarlo con una rapida diagnosi di laboratorio. La tempestività nella diagnosi sarà di aiuto nella predisposizione della quarantena e di misure di biosicurezza più rigorose. L’accesso ai capannoni di gruppi di pollame infetto o sospetto dovrà essere espressamente sorvegliato da personale di allevamento qualificato limitando, dopo accurata disinfezione, l’accesso ai veicoli e la rotazione delle attrezzature all’interno dell’allevamento.

Per contenere il focolaio al sito di origine, quando si sospetta o si conferma un caso di ILT in un gruppo di polli da carne, è necessario un coordinamento e una cooperazione a diversi livelli: operatori, personale di servizio in allevamento, altri produttori della regione, camion del mangimificio, macelli squadre di cattura, operai e qualsiasi veicolo che si trovi a spostarsi dentro o fuori l’azienda. E’ necessario un appropriato smaltimento della lettiera con compostaggio all’interno del capannone avicolo o approntare lo stoccaggio in luoghi lontani da altri capannoni o zone trafficate. Anche se il virus è sensibile a detergenti, disinfettanti ed alte temperature, la polvere e il materiale organico possono proteggerlo e prolungarne la sopravvivenza ed il periodo infettività. Il vento può essere un fattore importante nella diffusione della malattia. Il ILTV può rimanere infettante fino a 10 giorni negli escrementi, 70 giorni nelle carcasse e fino a 80 giorni negli essudati tracheali. Le temperature fredde possono contribuire ad estendere il periodo di infettività. Sole, calore e disseccamento inattivano il virus.

In un allevamento commerciale di ovaiole, che ospita solamente più gruppi di età, il controllo di un focolaio ILT risulta più impegnativo perché le misure di quarantena e di biosicurezza dovranno essere impiegate per periodi più lunghi. I gruppi infetti andranno considerati come continua fonte potenziale di diffusione dell’infezione all’interno dell’allevamento o di un’area. Il contenimento della diffusione della malattia in una estesa popolazione di ovaiole ed impianti di produzione in linea con un continuo flusso di veicoli e di attività lavorative è difficile, ma realizzabile. L’introduzione di volatili provenienti da altri gruppi, soprattutto se vaccinati o prove3nienti da allevamenti infetti o sospetti (es: il ricambio dei maschi in capannoni di riproduttori) dovrebbe essere evitata. Il percorso dei camion del mangimificio dovrebbe essere programmato in modo da servire gli allevamenti infetti o vaccinati a fine giornata ed i veicoli dovrebbero essere disinfettati immediatamente

all'ingresso e all'uscita dell'allevamento. Anche i guidatori dovrebbero seguire misure di biosicurezza.

Metodi di immunizzazione

La vaccinazione profilattica o preventiva è applicata in zone non infette ma a rischio di infezione e solamente è inserita in un programma sanitario integrato oppure in una strategia di limitazione della diffusione della malattia. In genere è utilizzato un vaccino ILTV vivo convenzionale somministrato tramite acqua di bevanda.

Tipologie di vaccini

Esistono essenzialmente due tipi di vaccini: vaccini ILTV vivi convenzionali e vaccini ILT vettorizzati. La prima tipologia vaccinale può presentare differenze sostanziali per quanto attiene le caratteristiche di patogenicità e trasmissibilità a seconda del ceppo di virus utilizzato ed il sistema di moltiplicazione. I vaccini ILTV vivi convenzionali possono essere coltivati in embrioni di pollo o in coltura cellulare. I vaccini riprodotti in embrioni di pollo sono più invasivi, inducono una maggiore reazione vaccinale e stimolano una risposta immunitaria più protettiva e prolungata. Al contrario, i vaccini cresciuti in coltura cellulare sono più attenuati, la reazione vaccinale è minima, ma l'immunità indotta è più debole e di breve durata. L'immunità si instaura entro 7-10 giorni dalla vaccinazione.

In commercio sono disponibili due tipi di vaccini ILT vettorizzati: vaccini vettorizzati a base di virus di diftero-vaiolo aviare o di herpes virus del tacchino. Questi virus vaccinali geneticamente ingegnerizzati hanno inserito nel genoma del vettore dei geni specifici del genoma del ILTV. Questi geni esprimono proteine rilevanti per il sistema immunitario che comportano il blocco dell'adesione del virus ILTV di campo alle cellule target dell'animale. Questi geni rappresentano una frazione molto piccola del genoma del virus. I principali vantaggi e benefici di questi vaccini vettorizzati sono la loro sicurezza e efficacia, poiché si eliminano gli effetti collaterali negativi dei vaccini ILTV vivi convenzionali. Ultimamente è stato utilizzato con successo nei polli da carne un metodo di controllo dei focolai ILT che prevede l'uso combinato di vaccini vivi ILT vettorizzati e di vaccini ILTV vivi convenzionali in campo, ciò consente di diminuire significativamente l'incidenza dei casi, le reazioni dei vaccini vivi e la diffusione del virus.

Nuovi ILTV vivi geneticamente modificati, potenziali candidati ad essere utilizzati come vaccini, sono stati allestiti eliminando uno specifico gene, non essenziale per la replicazione virale, coinvolto nella virulenza del virus. In questo modo si stimola l'induzione della risposta immunitaria come un virus attenuato e si minimizzano alcuni degli effetti collaterali indesiderati dei virus ILT vivi convenzionali. Per questo tipo di vaccini sono necessari ulteriori studi di efficacia e sicurezza di campo.

Anche se entrambe le tipologie di vaccini ILTV vivi convenzionali presentano dei vantaggi, come l'induzione di una risposta immunitaria protettiva, la possibilità di somministrazione

di massa, una stimolazione relativamente rapida dell'immunità ed un basso costo, ci sono forti implicazioni ed inconvenienti che precludono il loro uso indiscriminato in campo. Entrambe le tipologie di vaccini ILTV vivi convenzionali possono causare una reazione post-vaccinazione, ed interferire con la produttività degli animali, aumentando lo scarto, possono indurre uno stato di portatore permanente correlato all'infezione latente e persistente, caratteristica dell'herpesvirus, e causare nei volatili vaccinati il rilascio intermittente di virus e la sua diffusione nell'ambiente e possono infine essere coinvolti nei casi di reversione alla virulenza, in particolar modo i ceppi vaccinali propagati in embrioni di pollo.

Non bisogna dimenticare la stratta osservanza del periodo di sospensione del vaccino.

# CONCLUSIONI

I dati storici confermano la natura altamente infettiva, la resistenza e persistenza nell'ambiente dell'herpesvirus che causa la Laringotracheite. Inoltre, i tentativi utilizzati nel corso degli anni di controllare la malattia, basati sull'impiego di vaccini ILTV vivi convenzionali, hanno determinato un ciclo continuo di re-infezione e diffusione della malattia. In questo modo si sono alternati periodi di infezione silente e cicli di ricomparsa della malattia, alcune volte con caratteristiche di maggiore virulenza, causa di elevate perdite economiche soprattutto in aree ad alta densità avicola.

La rapida evoluzione dell'industria avicola verso sistemi di produzione intensiva ed elevate concentrazioni a livello di allevamento e/o regionale hanno reso più critico l'uso di misure rigorosa biosicurezza. Per contenere la malattia e il suo impatto economico si devono combinare un supporto diagnostico rapido con azioni coordinate ed integrate. L'uso di vaccini ILTV vivi convenzionali può essere utile nel controllo iniziale di un focolaio. Tuttavia, la vaccinazione incontrollata con questa tipologia di vaccini non è la soluzione migliore per un approccio a lungo termine.

Nei futuri programmi di prevenzione e controllo della ILT sarà più utile l'uso razionale di vaccini più sicuri, quali i vaccini ILT vettorizzati, combinato con procedure rigorose di biosicurezza all'interno di un quadro integrato su più livelli di misure di profilassi e di sorveglianza epidemiologica attiva.

# BIBLIOGRFIA


1. Bagus TJ et al. Avian Infectious Laryngotracheitis. Review of Science and Technology. 2000, 19(2): 483-92.

2. Beach JR. A filterable virus, the cause of infectious laryngotracheitis of chickens. Journal of Experimental Medicine. 1931, 54(6):809-916.

3. Blacker HP et al. Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. Australian Veterinary Journal, 2011, 89(3): 89-94.

4. Chacon JL et al. Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. Vaccine. 2009, 27:6731:38.

5. Chacon JL et al. Characterization by restriction fragment length polymorphism and sequence analysis of field and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus involved in severe outbreaks. Avian Pathology. 2010, 39(6): 425-33.

6. Chen HY et al. Interleukin-18-mediated enhancement of protective effect of an infectious laryngotracheitis virus glycoprotein B plasmid DNA vaccine in chickens. Journal of Medical Microbiology. 2011, 60: 110-6.

7. Coppo MJ et al. Comparative in vivo safety and efficacy of glycoprotein G-deficient candidate vaccine strain of infectious laryngotracheitis virus delivered via eye drop. Avian Pathology. 2011, 40(4): 411-7.

8. Coppo MJ et al. Comparison of replication and transmissibility of an infectious laryngotracheitis virus vaccine delivered via eye-drop or drinking water. Avian Pathology. 2012, 41(1): 99-106.

9. Coppo MJ et al. Comparison of replication and transmissibility of two infectious laryngotracheitis virus chicken embryo origin vaccines delivered via drinking water. Avian Pathology. 2012, 41(2): 195-202.

10. Cover MS. The earlty history of infectious laryngotracheitis. Avian Disease. 1996, 40: 494-500.

11. Davison S et al. Evaluation of efficacy of a live powlpox-vettorizzatied infectious laryngotracheitis / Avian encephalomyelitis vaccine against viral challenge Avian Disease. 2006, 50: 50-54.

12. Engstrom B et al. Successful control of infectious laryngotracheitis on multiage laying hen breader. Veterinary Record. 2011.

13. Fuchs W et al. In vitro and in vivo relevance of infectious laryngotracheitis virus gJ proteins that are expressed from spliced and nonspliced mRNAs. Journal of Virology. 2005, 79(2): 705-716.

14. Fuchs W et al. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. Veterinary Research. 2007, 38(2): 261-279.

15. Helferich D et al. The UL-47 gene of avian infectious laryngotracheitis virus is not essential for an in vitro replication but is relevant for virulence in chickens. Journal of General Virology. 2007, 88(3): 732-42.

16. Hughes CS et al. Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis. Research in Veterinary Science. 1987, 42: 407-10.

17. Johnson YJ et al. Wind-borne transmission of infectious laryngotracheitis between commercial poulty operations. Internal Journal of Poultry Science. 2005, 4(5): 263-67.

18. Garcia M et al. Characterization of infectious laryngotracheitis virus: Demonstration of viral sub-populations within vaccine preparations. Avian Diseases. 2001, 45: 558-66.

19. Guy JS et al. Increased virulence of modified-live infectious laryngotracheitis vaccine virus following bird-to-bird passage. Avian Diseases. 1991, 35: 348-55.

20. Oldoni I et al. Pathogenicity and growth characteristics of selected infectious laryngotracheitis virus strains from the United States. Avian Pathology. 2009, 38(1): 47-53.

21. Rodriguez-Villa A et al. Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines against a recent challenge strain from the United States. Avian Pathology. 2008, 37(3): 287-92.

22. Sang-Wong Lee et al. First Complete Genome Sequence of infectious laryngotracheitis virus. BMC Genomics. 2011, 12:197.

23. Sang-Wong Lee et al. Attenuated vaccines can recombine to from virulent field viruses. Science. 2012, 337(6091): 188.

24. Tong GZ et al. Protection of chickens from infectious laryngotracheitis with a recombinant fowlpox virus expressing glycoprotein B on infectious laryngotracheitis virus. Avian Pathology. 2001, 30(2): 143-8.

25. Zavala G et al. Factors interfering with the control of infectious laryngotracheitis (ILT): Vaccine inter reference, Persistence of ILTV in the field, and Relative virulence of recent ILTV isolates. Project No. 648 US Poultry Association. 2010.

# RINGRAZIAMENTI

Dopo cinque anni sono ancora qui a scrivere i ringraziamenti di una tesi, la cosa comincia a farsi preoccupante!

Prima di tutto a Denise, non specifico nemmeno il perché, sarebbe troppo lungo.

Al Prof. Cerri, impossibile immaginare la Scuola senza di lui, e alla Dr.ssa Ebani, che ha avuto la sfortuna e la pazienza di supportarmi e sopportarmi nella stesura di questa tesi.

Alla mia famiglia, quelli che ci sono e quelli che non ci sono più, che mi ha sostenuto sempre in tutto quello che ho fatto.

Alla mia seconda famiglia di Roma, che mi ha accolto e mi ha fatto sentire come uno di loro.

Al mio Direttore e ai miei colleghi dell'ufficio, con cui ho il piacere di condividere la quotidianità.

Alle meravigliose persone che ho incontrato in questo percorso di tre anni, che hanno imparato quanto può essere pericoloso mostrarmi amicizia (vero Michelangelo, Marco ed Enrico?) ed ai quali non smetterò mai di essere grato per avermi fatto crescere.

E, come avevo già detto cinque anni fa, anche a me. Un po' di sano e meritato egoismo.

Alla prossima, anche se ne fare volentieri a meno…