

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA ISOLATI RECENTEMENTE IN ITALIA

Bonci M.¹, Giovanardi D.², Pesente P.², Morandini E.², Lupini C.¹, Cecchinato M.³, Rossi G.², Catelli E.¹

¹ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, *Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 5 - 40064 Ozzano Emilia (BO) - ITALIA

² Laboratorio Tre Valli, Viale Apollinare Veronesi, 5 - 37132 San Michele Extra, Verona - ITALIA

³ Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), ITALIA

Summary

Three non-vvIBDV strains detected in two broiler flocks were sequenced and compared to IBDV reference and Italian strains. The flocks, which belonged to two intensive farms located in Northern Italy, were vaccinated against IBDV and experienced recurrent bacterial infections and poor performances. Nucleotide sequence analysis of a 406bp-fragment of the genome, coding for the hypervariable region of VP2, revealed a homology of 100% between two of the strains and of 99% between them and the third one. Predicted amino acid sequences of the three strains were identical. When compared to classical, attenuated, very virulent and variant reference strains, as well as to Italian strains, they revealed to belong to a separate cluster. They showed a maximum degree of nucleotide and amino acid identity (95% and 95,6%, respectively) with only one IBDV strain, among those whose sequences are available in GenBank. At the amino acid level, the homology between the analyzed strains and published Italian strains ranged from 88% to 91%. Amino acid substitutions were observed in two of the hydrophilic peaks of VP2. Further studies are needed to evaluate the pathogenicity of these peculiar strains, their circulation in commercial broiler farms and the extent of protection offered against them by commercial IBDV vaccines.

INTRODUZIONE

Il virus della bursite infettiva (IBDV) appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, all'interno del genere *Avibirnavirus*. E' un virus privo di envelope, a simmetria icosaedrica, con diametro compreso tra 55 e 65 nm. Si conoscono due sierotipi di IBDV: il sierotipo 1, che comprende ceppi classici, varianti e *very virulent* (vvIBDV), e il sierotipo 2, che raggruppa esclusivamente ceppi apatogeni. I ceppi varianti sono comparsi negli Stati Uniti a metà degli anni '80, eludono l'immunità di origine materna indotta da vaccini contenenti ceppi classici e provocano lesioni bursali non apprezzabili macroscopicamente. Indipendentemente dal grado di patogenicità del ceppo coinvolto e dalla gravità del quadro clinico, l'infezione da IBDV si accompagna sempre ad un danno a carico del tessuto bursale, e quindi ad immunosoppressione, più grave se gli animali sono colpiti nelle prime tre settimane di vita. Il genoma di IBDV è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento, rispettivamente di circa 3.300 (segmento A) e 2.900 (segmento B) pb. Il segmento A codifica per tre proteine strutturali (VP2, VP3 e VP4), prodotte sottoforma di un precursore unico che va incontro a clivaggio per dare origine alle tre singole proteine, e per una proteina non strutturale (VP5) che si ritiene abbia un ruolo

importante nella patogenesi. Il segmento B codifica per la polimerasi virale (VP1) (Etteradossi e Saif, 2008).

Tra le proteine strutturali la VP2, componente del capsid virale, è quella maggiormente studiata in quanto principale immunogeno di IBDV. La regione della VP2 compresa tra gli aminoacidi (aa) 206 e 350 del segmento A, definita "ipervariabile", comprende due picchi idrofili maggiori (P_{BC} , tra gli aa 212 e 224 e P_{HI} , tra gli aa 314 e 324) e due picchi idrofili minori (P_{DE} , tra gli aa 249 e 254 e P_{FG} , tra gli aa 279 e 289); i primi rappresentano gli epitopi neutralizzanti, mentre negli altri si localizzano aminoacidi che influenzano l'adattamento alle colture cellulari e la virulenza (Bayliss *et al.*, 1990; Coulibaly *et al.*, 2005). E' stato dimostrato che mutazioni di singoli aminoacidi della regione ipervariabile possono, a seconda della loro localizzazione, determinare l'elusione della risposta anticorpale indotta dalla vaccinazione, come accade per le varianti, o modificare il tropismo cellulare (Jackwood *et al.*, 1997; Brandt *et al.*, 2001; Jackwood *et al.*, 2008; Jackwood e Sommer-Wagner, 2011).

In Italia nell'ultimo decennio si è registrata la prevalente circolazione di vvIBDV, seguita dai ceppi classici. E' stata inoltre evidenziata la presenza di ceppi correlati a virus vaccinali e di ceppi che, pur essendo correlati coi ceppi classici, si distinguono chiaramente da questi (Moreno *et al.* 2007; Moreno *et al.*, 2010).

Obiettivi del presente studio sono stati: 1) valutare, mediante RT-PCR, la presenza di IBDV in gruppi di polli da carne che, pur non presentando un quadro clinico ed anatomopatologico palesemente riconducibile a bursite infettiva, erano caratterizzati da uno stato sanitario scadente e da prestazioni produttive inferiori a quelle attese, in allevamenti in cui tali problemi si ripresentavano da svariati cicli produttivi; 2) discriminare i ceppi riconducibili a vvIBDV dai non vvIBDV mediante *Restriction Enzyme Analysis* (REA); 3) sequenziare, nei soli ceppi non risultati vvIBDV, la regione ipervariabile della VP2, analizzarne la sequenza nucleotidica e la sequenza aminoacidica e confrontarle con le sequenze di IBDV pubblicate in *GenBank* e con quelle di ceppi italiani presenti in letteratura.

MATERIALI E METODI

Gruppi campionati

Sono stati oggetto del campionamento due gruppi di broiler (identificati come gruppo 1 e gruppo 2) appartenenti ad altrettanti allevamenti situati in due diverse regioni del nord Italia caratterizzate da un'elevata densità di aziende avicole. Entrambi i gruppi, il cui ciclo produttivo si è svolto nella primavera del 2011, erano stati oggetto di profilassi vaccinale nei confronti della bursite infettiva, con piani vaccinali diversificati che prevedevano l'uso di vaccini del commercio. Sia nel gruppo 1 che nel gruppo 2 si osservavano infezioni batteriche ricorrenti e ridotte *performance*.

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato: nel gruppo 1 a 21 e a 33 giorni d'età; nel gruppo 2 a 17 e a 36 giorni d'età. Ad ogni campionamento è stata prelevata la borsa di Fabrizio da 8 animali. I campioni sono stati processati in due pool di quattro borse ciascuno.

Estrazione dell'RNA virale

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata con il kit del commercio QIAamp Viral RNA[®] (Qiagen) conformemente alle istruzioni della casa produttrice, a partire da omogenati di borse in *phosphate buffered saline* (PBS).

RT-PCR

L'RT-PCR è stata eseguita secondo il protocollo descritto da Jackwood *et al.* (2006), che consente di amplificare un frammento di 743pb del gene codificante per la VP2, situato nella regione ipervariabile della stessa.

Restriction enzyme analysis (REA)

I prodotti dell'RT-PCR sono stati trattati con l'enzima di restrizione *SspI*, che riconosce la sequenza ^{5'}AAT ATT^{3'} presente nei vvIBDV, all'interno della sequenza amplificata (Lin *et al.*, 1993, Jackwood e Sommer, 1999). La presenza della sequenza bersaglio fa sì che il prodotto dell'RT-PCR sia tagliato dall'enzima in due frammenti di 274 e 469pb ciascuno.

Sequenziamento e analisi di sequenza

I prodotti amplificati che, in base all'esito della REA non risultavano appartenere a vvIBDV, sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) secondo le istruzioni della casa produttrice e sequenziati, in entrambe le direzioni, con il sequenziatore a capillari 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) presso Bio-Fab Research (Roma). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate, utilizzando il software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007), alle sequenze del gene della VP2 dei ceppi di IBDV di seguito indicati e presenti in *GenBank* (tra parentesi è indicato il numero di accesso alla sequenza): F52/70 (Y14958) e STC (D00499), rappresentativi dei ceppi classici; Int228E (AF457104), Cu1 (D00867) e D78 (Y14962), rappresentativi dei ceppi classici attenuati, Var-E (D10065) e Var-A (M64285) rappresentativi delle varianti statunitensi; DV86 (Z25482), OKYM (D49706), UK661 (X92760), 91168 (Y14957), 89163 (Y14956), 89224 (AJ001942), 849VB (X95883), BR1 (AY525106), 99323 (AJ583500) e GLS (Q82628), rappresentativi dei vvIBDV e con i ceppi IBDVRF-5/94 (Z97002) e UPM08SF2 (GQ131545). Le sequenze aminoacidiche sono state confrontate, oltre che con quelle dei ceppi summenzionati, con quelle di 16 ceppi italiani riportate da Moreno *et al.* (2007).

Analisi filogenetica

Per selezionare il modello evolutivo più idoneo per la costruzione dell'albero filogenetico sono stati impiegati, rispettivamente per le sequenze nucleotidiche e per quelle aminoacidiche, i software *JModelTest* 2.1.2 (Darriba *et al.*, 2012) e *ProtTest* 3.2 (Darriba *et al.*, 2011) utilizzando come criterio di selezione il *Bayesian Information Criterion* (BIC). Gli alberi filogenetici sono stati quindi costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood col software PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010). I valori di *bootstrap*, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il genoma di IBDV è stato evidenziato in entrambi i gruppi. In particolare: nel gruppo 1 è risultato positivo a RT-PCR un pool di borse prelevate a 21 giorni d'età; nel gruppo 2 sono risultati positivi un pool di borse prelevate a 17 giorni e i due pool di borse prelevate a 36 giorni d'età. Nessuno degli amplificati presentava il sito di restrizione che caratterizza i vvIBDV, perciò sono stati sequenziati e identificati come segue: ITA-01 (Gruppo 1, 21

giorni), ITA-02 (Gruppo 2, 17 giorni) e ITA-03 (Gruppo 2, 36 giorni: è stato sequenziato il prodotto della RT-PCR di un solo pool). L'analisi filogenetica è stata effettuata, per la sequenza nucleotidica, su una porzione di 406 nucleotidi compresa tra le posizioni 786 e 1191 del segmento A e, per la sequenza aminoacidica, su una porzione della VP2 di 136 aa, compresa tra l'aa 219 e l'aa 354 (numerazione secondo Bayliss *et al.* (1990)). I risultati dell'analisi filogenetica basata sulle sequenze aminoacidiche sono riportati nella figura 1.

Dall'analisi filogenetica risulta che i tre ceppi clusterizzano tra loro, ma formano un cluster distinto, sia a livello nucleotidico che a livello aminoacidico, rispetto ai ceppi di riferimento e a quelli analizzati da Moreno *et al.* (2007). Infatti tra ITA-01 e ITA-03 c'è un'identità nucleotidica del 100%, mentre tra questi e ITA-02 l'identità nucleotidica è del 99%, in quanto si differenziano per 3 basi nucleotidiche. Tali mutazioni sono tuttavia silenti in quanto l'identità aminoacidica fra i tre ceppi è del 100%. L'affinità nucleotidica dei ceppi analizzati coi ceppi di riferimento non supera il 92% e, tra le sequenze depositate in *GenBank*, quella che più si avvicina ad essi appartiene al ceppo IBDVRF-5/94 (similarità nucleotidica del 95% ed aminoacidica del 95,6%). Il confronto coi ceppi italiani, possibile sulla base della sola sequenza aminoacidica, in quanto la sequenza nucleotidica di tali ceppi al momento non risulta depositata in *GenBank*, evidenzia un grado di similarità compreso tra l'88% e il 91%.

Rispetto ai ceppi circolanti in Italia (Moreno *et al.*, 2007) i ceppi analizzati nel presente lavoro presentano delle differenze nella sequenza aminoacidica in posizione 220, 222, 253, 256, 258, 260, 269, 270; in comune con alcuni di essi presentano una serina in posizione 254, una treonina in posizione 270 e una serina in posizione 299. Alcune di tali mutazioni ricadono all'interno dei picchi idrofili P_{BC} (aa 212 – aa 224) e P_{DE} (aa 249 – aa 254), altre nelle immediate vicinanze degli stessi. Moreno *et al.* (2010) riportano che ceppi dotati di una mutazione in posizione 254 sono di sempre più frequente riscontro in Italia. Sulla base di studi condotti su ceppi Del-E (variante statunitense), Jackwood e Sommer-Wagner (2011) ipotizzano che mutazioni puntiformi in posizione 254 o in posizione 222 contribuirebbero, da sole, al fenomeno dell'*antigenic drift*.

CONCLUSIONI

I ceppi di IBDV analizzati in questo studio presentano delle caratteristiche genomiche peculiari, ad oggi non segnalate in altri IBDV. Saranno condotti studi mirati a definirne la patogenicità e la protezione conferita, nei loro riguardi, dai vaccini di più comune impiego nella profilassi della bursite infettiva. Sarà inoltre opportuno estendere, possibilmente all'intero segmento A del genoma, la caratterizzazione molecolare di questi virus e confrontarli con altri ceppi di campo e con i virus vaccinali. Infine ulteriori studi in allevamenti intensivi potranno dare informazioni sulla diffusione di questi ceppi ed, eventualmente, contribuire a comprenderne l'epidemiologia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bayliss C.D., Spies U., Shaw K., Peters R.W., Papageorgiou A., Müller H., Boursnell M.E.G. (1990). A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71: 1303-1312.

2. Brandt M, Yao K., Liu M., Heckert R.A., Vakharia V. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75(24): 11974-11982.
3. Coulibaly F., Chevalier C., Gutsche I., Pous J., Navaza J., Bressanelli S., Delmas B., Rey F.A. (2005). The Birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell.* 120:761-772.
4. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D.(2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 27:1164-1165.
5. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
6. Eterradossi N., Saif Y. M. (2008). Infectious bursal disease. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson S.R., McDougald L.R., Nolan L.R., Swayne D.E. (Eds). *Diseases of Poultry 12th Edition* pp. 185-208.
7. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59(3):307-21.
8. Jackwood D.J. e Sommer S.E. (1999). Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. *Avian Dis.* 43:310-314.
9. Jackwood D.J. e Sommer-Wagner S. E. (2011). Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 409: 33-37.
10. Jackwood D.J., Jackwood R.J., Sommer S.E. (1997). Identification and comparison of point mutations associated in classic and variant infectious bursal disease viruses. *Virus Res.* 49: 131-137.
11. Jackwood D.J., Cookson K.C., Sommer-Wagner S.E., Le Galludec H., De Wit J.J. (2006). Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis.* 50:532-536.
12. Jackwood D.J., Sreedevi B., LeFever L.J., Sommer-Wagner S.E. (2008). Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity. *Virology* 377: 110-16.
13. Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
14. Lin Z., Kato A., Otaki Y., Nakamura T., Sasmaz E., Ueda S. (1993). Sequence comparisons of highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. *Avian Dis* 37:315-323.

15. Moreno Martin A., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Eterradossi N., Ceruti R., Cordioli P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious burdal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis.* 51: 863-872.
16. Moreno A., Barbieri I., Ceruti R., Morandini E., Cordioli P. (2010). Caratterizzazione genomica di ceppi del virus della malattia di Gumboro isolati in Italia nel periodo 2006-2009. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2010*, pp.199-203.

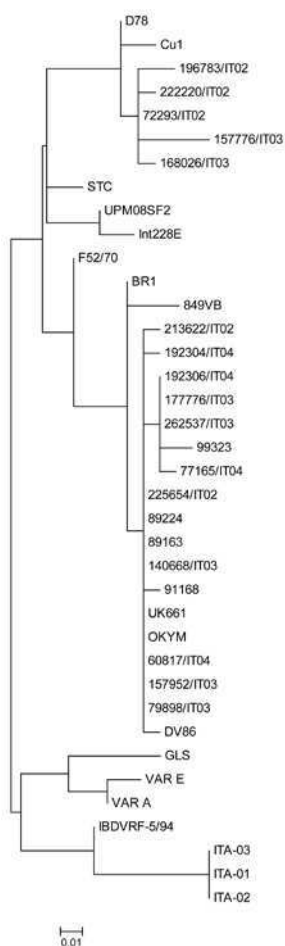


Figura 1. Albero filogenetico di ceppi di IBDV. L'albero è basato sulla sequenza aminoacidica di una porzione della regione ipervariabile del gene VP2 compresa tra l'aa 219 e l'aa 354, utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood col software PhyML 3.0. La barra rappresenta la distanza aminoacidica espressa come sostituzioni aminoacidiche per sito. Sono riportati solo valori di *bootstrap* > 70.