

3. Consiglio dell'Unione Europea (CE) 2003. Regolamento (CE) N. 2160/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti. *Off. J. L325*, 12/12/2003, 1-15.
4. Di Giannatale E, Prencipe V, Colangeli P, Alessiani A, Barco L, Staffolani M, Tagliabue S, Grattarola C, Cerrone A, Costa A, Pisanu M, Santucci U, Iannitto G, Migliorati G. (2010). Prevalenza di *Campylobacter* termotolleranti nel pollo da ingrasso in Italia. *Vet. Ital.* 46(4): 405-414.
5. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(5):3196
6. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(3):3590.
7. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2014; 12(2):3547.
8. EFSA e ECDC. Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129.
9. Horrocks SM, Anderson RC, Nisbet DJ, Ricke SC. (2009). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Food Microbiol.* 15:18-25.
10. ISO 10272-1:2006: Microbiology of food and animal feeding stuff- Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp.* Part I: detection method
11. Ladely SR, Harrison MA, Fedorka-Cray PJ, Berrang ME, Englen MD, Meinersmann RJ. (2007). Development of macrolide-resistant *Campylobacter* in broiler administered subtherapeutic or therapeutic concentration of tylosin. *J. Food Protect.* 70: 1945-1951.
12. Mayr AM, Lick S, Bauer J, Thärigen D, Busch U, Huber I. (2010). Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. *J. Food Prot.* 73(2):241-250.
13. Mylius SD, Nauta MJ, Havelaar AH. (2007). Cross-contamination during food preparation: a mechanistic model applied to chicken-borne *Campylobacter*. *Risk Analysis.* 27(4): 803-813.
14. Nachamkin I, Ung H, Li M. (2002). Increased fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*, Pennsylvania, USA, 1982-2001. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1501-1503.
15. Ricci A, Amato S, Barco L. (2006). Prevalence of *Campylobacter spp.* in broiler chicken farms of Veneto Region. *Rivista di Avicoltura*, 75(6): 15.
16. Rugna G, Meriardi G, Bardasi L, Bassi S, Dell'Anna S, Fontana MC, Galletti G, Massi P, Santi A, Tamba M. (2009). Indagine sulla diffusione di *Campylobacter spp.* nei broiler macellati in Emilia- Romagna. Atti del XIX Convegno Nazionale AIVI, Perugia 24-25-26 giugno, 2009

## IDENTIFICAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENOMICO DEI CEPPI DI VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO (IBDV) ISOLATI NEL POLLO DA CARNE IN ITALIA E IN PAESI ESTERI NEGLI ANNI 2012, 2013 E 2014

Massi P.<sup>1</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Barbieri I.<sup>2</sup>, Casadio M.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Sezione di Forlì, via Marchini n.1 -forli@izsler.it

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-Brescia-

### Summary

Viral population dynamics of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) and four non-very virulent IBDV isolated in Italy since 2012 have been analysed and compared to IBDV reference strains. The strains were collected by the intensive farm of five Regions (North, Center and Sud of Italy). The viral population structure of vvIBDV strains showed a strong relationship between geography and phylogeny, with one main group of vvIBDV observed. The low variability and the geographical pattern observed indicate that the virus evolves slowly, occupying the same geographical niche for a long time as for example in Romagna Region. Probably it is depend to the biological features of the virus: being able to remain viable for long periods of time due to a strong environmental resistance, and as an immunosuppressive agent, capable to elude temporally the immune system of the host. About the four nonvvIBDV in commercial broiler, tree of witch in Romagna, is need, for the future, to evaluate their circulation, pathogenicity and the protection offered against them by commercial IBDV vaccines.

In the second part of this study 52 IBDV strains were genetically characterized and compared with reference IBDV strains. Results of the genetic characteristics revealed that the majority of virus (82%) were related to vvIBDV strains. Diagnostic assays that can reliably identify vvIBDV and nonvvIBDV strains are needed for surveillance programs designed to monitor the spread of these viruses.

### INTRODUZIONE

La Malattia di Gumboro (IBD) è sostenuta da un virus che appartiene alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. E' stata segnalata circa 50 anni fa ed attualmente è considerata essere endemica nella maggior parte dei paesi a produzione avicola e rappresenta una delle maggior cause di perdita economica per l'industria avicola (Van Der Berg et al., 2000). Il virus IBD causa una malattia acuta ed altamente contagiosa per gli animali giovani (Muller et al., 1979). 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 ceppi apatogeni.

Indipendentemente dal grado di patogenicità del ceppo coinvolto, l'infezione da IBDV si accompagna sempre ad un danno a carico della borsa di Fabrizio, e quindi, ad immunodepressione specialmente negli animali nelle prime tre, quattro settimane di vita. Il genoma virale è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento,

rispettivamente di circa 3.300 pb (segmento A) e 2.900 pb (segmento B). Il segmento A codifica per tre proteine strutturali (VP2, VP3 e VP4) e per una proteina non strutturale (VP5) che si ritiene importante nella patogenesi. Il segmento B codifica per l'RNA polimerasi (VP1) (Van den Berg, 2000) e che codifica le funzioni essenziali per la replicazione e trascrizione (Von Einem et al., 2004). Tra le proteine strutturali la VP2 è stata quella maggiormente studiata in quanto rappresenta il principale antigene immunodominante dell'IBDV (Vakharia et al., 1994). La regione della VP2 compresa tra gli aminoacidi (aa) 206 e 350 del segmento A, definita "ipervariabile" comprende due picchi idrofilici maggiori che rappresentano gli epitopi neutralizzanti e due picchi idrofilici minori che influenzano la virulenza (Coulibaly et al., 2005). Mutazioni di singoli aminoacidi della regione ipervariabile possono determinare l'elusione della risposta anticorpale indotta dalla vaccinazione, come accade per le varianti, o modificare il tropismo cellulare (Jackwood e Sommer-Wagner, 2011). Nel 1987 furono isolati ed identificati in Europa i ceppi very virulent (vvIBDV) che molto velocemente si sono diffusi in Africa, Asia e Sud America (Lukert e Saif, 1997). In Italia negli inizi degli anni '90 sono stati identificati i primi ceppi very virulent (vvIBDV) in aree geografiche ben definite come la Romagna che rappresentava l'area maggiormente colpita. Quindi negli anni si è assistito ad un diffondersi progressivo della patologia da virus vv anche in altre Regioni ad alta vocazione avicola per poi assistere alla circolazione di ceppi virali classici. Inoltre è stata evidenziata la presenza di ceppi correlati a virus vaccinali ed in parte a ceppi classici (Moreno et al., 2007, Moreno et al., 2010).

Nel 2013 Bonci et al. segnalavano la caratterizzazione molecolare di tre ceppi di campo non vvIBDV che presentavano marcate differenze nella sequenza aminoacidica sia nei confronti dei ceppi circolanti in Italia sia nei confronti di sequenze del gene della VP2 di ceppi di IBDV presenti in GenBank.

Obiettivo del seguente studio è stato quello di raccogliere i risultati dell'attività di sequenziamento della regione ipervariabile della proteina VP2 eseguita su 92 ceppi di IBDV isolati in cinque regioni italiane e su 52 ceppi di IBDV isolati da campioni provenienti da 15 Paesi Esteri dal 2012 ad oggi. L'elaborazione dei risultati della caratterizzazione genomica dei ceppi di IBDV identificati è risultata utile ai fini di una valutazione della circolazione dei genotipi circolanti attualmente sul territorio nazionale e della circolazione dei principali genotipi circolanti in Paesi Esteri che possono avere scambi commerciali con l'Italia.

## MATERIALI E METODI

### -Isolati.

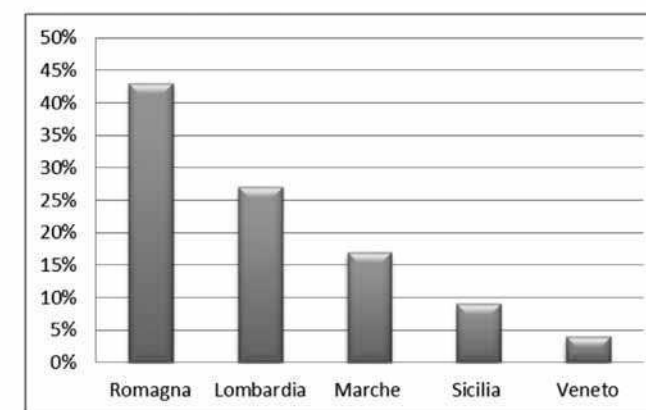
I virus IBDV sono stati isolati nell'ambito dell'attività di diagnostica e di monitoraggio eseguita presso la Sezione Diagnostica di Forlì-IZSLER. Lo studio è stato condotto a partire da organi animali, borse di Fabrizio e su materiale patologico impresso su FTACards® (Woolfe A. et al. (2005) (Seahorn H. et al., 2011) di animali provenienti da allevamenti con sintomatologia clinica e/o lesioni riferibili a Malattia di Gumboro.

### -Ceppi di IBDV isolati da 5 Regioni Italiane.

I virus IBDV erano isolati a partire da: carcasse animali (23 campioni); borsa di Fabrizio (38 campioni) e FTACards (31 campioni). Le forme cliniche osservate erano, in generale, non molto gravi con edema o atrofia della borsa di Fabrizio e lieve aumento della mortalità. Solo in pochi casi è stata rilevata una mortalità superiore a 4-5%. I

materiali patologici provenivano da allevamenti di broiler di cinque Regioni Italiane dal 2012 ad oggi. Nella stragrande maggioranza degli allevamenti veniva applicata la vaccinazione: o in incubatoio con vaccini biotecnologici o in allevamento con vaccini tradizionali mild o intermediate plus. I campioni analizzati provenivano da cinque Regioni italiane come illustrato in figura n.1

**Figura 1:** 92 distribuzione percentuale degli isolati di IBDV provenienti da 5 diverse regioni italiane

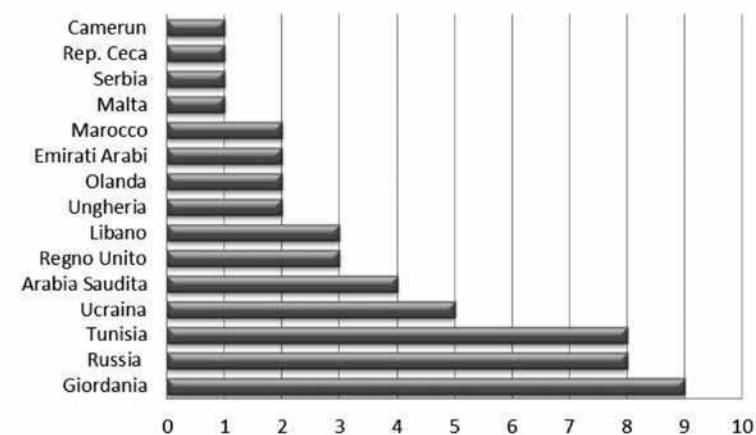


### -Ceppi di IBDV isolati da campioni provenienti da 15 Paesi Esteri.

Il campione era costituito dalla borsa di Fabrizio (6 campioni) o da FTACards (46 campioni). Non si avevano informazioni anamnestiche sugli animali e allevamenti in quanto per questi campioni è richiesto solo un servizio diagnostico di isolamento e sequenziamento dei ceppi virali.

I campioni analizzati provenivano dai seguenti Paesi come da figura n.2

**Figura 2:** 52 isolati di IBDV, provenienza da 15 Paesi esteri



## Rt-PCR

I campioni sono stati testati per rilevare la presenza del genoma virale tramite la metodica rt-PCR descritta da Eterradossi et al., (1997b). Detta metodica utilizza primers specifici che amplificano un frammento di 516bp del segmento A del genoma codificante la regione ipervariabile (HVR) della proteina VP2.

## Sequenziamento ed analisi filogenetica

I prodotti PCR ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers dell'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500xl ( Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASStar). Il confronto delle sequenze con il pannello di ceppi di riferimento utilizzati in routine e di ceppi disponibili in GenBank è stato effettuato mediante allineamento multiplo con il programma MEGA 5.

I ceppi sono stati confrontati con le sequenze del pannello di virus utilizzati come riferimento nell'analisi di routine ( F52/70, DV86, Bursine 2, D78, 228E, Gumbovax Transmune, AviproIBDxtreme, Bur.706, Vaxxitech) e con ceppi disponibili in GeneBank (●).

## RISULTATI

I risultati dell'attività di sequenziamento dei 92 ceppi italiani sono riportati nella tabella n.1.

I ceppi IBVD (25) provenienti dalla Lombardia, tranne in due casi di sequenza mista, hanno presentato un'omologia che va dal 98 al 100% nei confronti unicamente di ceppi vaccinali: 9 ceppi hanno presentato la maggior omologia nei confronti del ceppo vaccinale Transmune; 13 verso il ceppo vaccinale D78; 1 ceppo verso il ceppo vaccinale 228E. Per i 39 ceppi isolati in Romagna la situazione risulta molto più variegata: 12 ceppi hanno presentato una maggior omologia nei confronti del ceppo vvDV86; 8 ceppi verso il ceppo vaccinale Transmune; ; 3 ceppi verso il ceppo vaccinale 22E; 2 ceppi verso il ceppo vaccinale Bursine2; 2 ceppi verso il ceppo vaccinale D78 e per ultimo 3 ceppi verso il ceppo "non virulent"IT03. Per 8 ceppi provenienti dalla Sicilia si evidenziano 4 ceppi che hanno presentato la maggior omologia verso il ceppo vvDV86; 1 verso il ceppo vv3529/92; 2 verso il ceppo vaccinale D78 ed 1 con sequenza mista. Fra i 16 ceppi provenienti dalle Marche, 6 virus presentano la maggior omologia verso il ceppo vvDV86; 1 ceppo verso il ceppo vvKs; 2 ceppi verso il ceppo vaccinale 22E; 4 verso il ceppo vaccinale D78; 1 verso il ceppo vaccinale Transmune ed 1 verso il ceppo vaccinale Vaxxitek e 1 con sequenza mista. Per i ceppi dal Veneto si registrano 1 ceppo che ha presentato la maggior omologia verso il ceppo vvDV86; 1 ceppo verso il ceppo vvMG8; 1 ceppo verso il vaccino Transmune ed 1 ceppo verso il ceppo di campo "non virulent" IT03.

**Tabella 1:** risultati del sequenziamento di 92 ceppi di IBVD campionati in Italia

Nr	Regione Italiana	N.Darwin/IZSLER	campione	Risultati sequenziamento
1	Lombardia	42017/2012	Borsa di Fabrizio	100% Transmune
2		115508/2012	borsa	Sequenza mista
3		126163/2012	borsa	99,2% 228E
4		126169/2012	borsa	99,6% D78
5		168923/2012	borsa	99,8% Transmune
6		168924/2012	borsa	100% Transmune
7		336696/2012	FTAcad	99% D78
8		336703/2012	card	99% D78
9		336705/2012	card	98,8% D78
10		336711/2012	card	Sequenza mista
11		336716/2012	card	98,8% D78
12		336720/2012	card	98,8% D78
13		348225/2012	borsa	98,6% D78
14		348226/2012	borsa	98,8% D78
15		348227/2012	borsa	98,8% D78
16		348231/2012	borsa	99% D78
17		348233/2012	borsa	99% D78
18		348235/2012	borsa	99% D78
19		8678/2013	carcassa	100% Transmune
20		9426/2013	borsa	100% Transmune
21		9430/2013	borsa	100% Transmune
22		9438/2013	card	99,8% Transmune
23		9444/2013	card	99,8% Transmune
24		37089/2013	carcassa	100% Transmune
25		275408/2013	borsa	99,6% D78
26	Romagna	47894/2012	Carcassa	Non determinata
27		85841/2012	Carcassa	Sequenza mista
28		123878/2012	carcassa	99,2% 228E
29		127065/2012	carcassa	98,5% DV86
30		156286/2012	borsa	96,3% DV86
31		166812/2012	borsa	96,1% DV86

Nr	Regione Italiana	N.Darwin/IZSLER	campione	Risultati sequenziamento
32		166815/2012	borsa	95,8% DV86
33		174192/2012	card	99% Transmune
34		174198/2012	card	99,8% Transmune
35		174200/2012	card	99,4% DV86
36		175587/2012	carcassa	99,6% DV86
37		178719/2012	carcassa	99,6% D78
38		178894/2012	card	99,8% Transmune
39		178896/2012	card	99,6% Transmune
40		183965/2012	carcassa	Sequenza mista
41		183968/2912	carcassa	Sequenza mista
42		210329/2012	carcassa	96,7% DV86
43		266294/2012	card	97,2% DV86
44		332089/2012	carcassa	96,2% DV86
45		56733/2013	card	99% Transmune
46		56735/2013	card	99% IT03
47		91208/2013	carcassa	99,4% 228E
48		103123/2013	carcassa	99,8% Transmune
49		103132/2013	carcassa	100%Bursine 2
50		140117/2013	card	99% IT03
51		152370/2013	card	97,2% DV86
52		166499/2013	carcassa	Non determinata
53		185515/2013	carcassa	99% 228E
54		297912/2013	borsa	Non determinata
55		297932/2013	borsa	100% Transmune
56		297943/2013	borsa	Non determinata
57		304011/2013	card	99% IT03
58		309372/2013	carcassa	100% Vaxxitech
59		340767/2013	borsa	100%Vaxxitech
60		348495/2013	card	97,6% DV86
61		14508/2014	carcassa	99,8% Transmune
62		35648/2014	card	96,9% DV86
63		46453/2013	card	99,8% Bursine
64		58895/2014	card	99% D78

Nr	Regione Italiana	N.Darwin/IZSLER	campione	Risultati sequenziamento
65	Sicilia	71064/2012	borsa	97,4% DV86
66		271384/2012	borsa	99,2% D78
67		271392/2012	borsa	99,6% D78
68		355847/2013	borsa	97% DV86
69		7317/2014	carcassa	98% ceppo 3529/92 in blast
70		42481/2014	borsa	Sequenza mista
71		42485/2014	borsa	97,1% DV86 98% 3529/92
72		52840/2014	borsa	98% DV86
73	Marche	93772/2912	borsa	91,3% 228E
74		115544/2012	borsa	96,6% DV86
75		120090/2012	borsa	98,4% D78
76		120110/2012	borsa	98,3% DV86
77		195501/2012	Borsa	97,5% DV86
78		195514/2012	carcassa	Non determinata
79		195516/2012	carcassa	96,1% DV86
80		195522/2012	borsa	98,6% D78
81		195527/2012	borsa	98,8% D78
82		195586/2012	borsa	97,3% D78
83		212662/2012	carcassa	99,6% DV86
84		95714/2013	card	100% Transmune
85		139146/2013	card	100% Vaxxitech
86		151153/2013	card	99,4% 228E
87		323479/2013	card	97,2% DV86
88		10429/2014	card	97% ceppo Ks in blast
89	Veneto	130808/2013	card	95,6% DV86
90		302883/2013	card	99% IT03
91		355835/2013	borsa	92,4% Transmune
92		23022/2014	card	88,6% DV86 95% MG8

In Figura n.3 è rappresentato l'albero filogenetico dei ceppi italiani in cui si vede come i quattro ceppi omologhi al ceppo IT03 rappresentano un cluster unico e ben distinto dai ceppi "very virulent".

**Figura 3:** dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del gene VP2 dei ceppi di IBDV campionati in Italia oggetto dello studio. I ceppi sono confrontati con le sequenze del pannello di virus utilizzati come riferimento nell'analisi di routine (◆) e con ceppi disponibili in GeneBank (●)



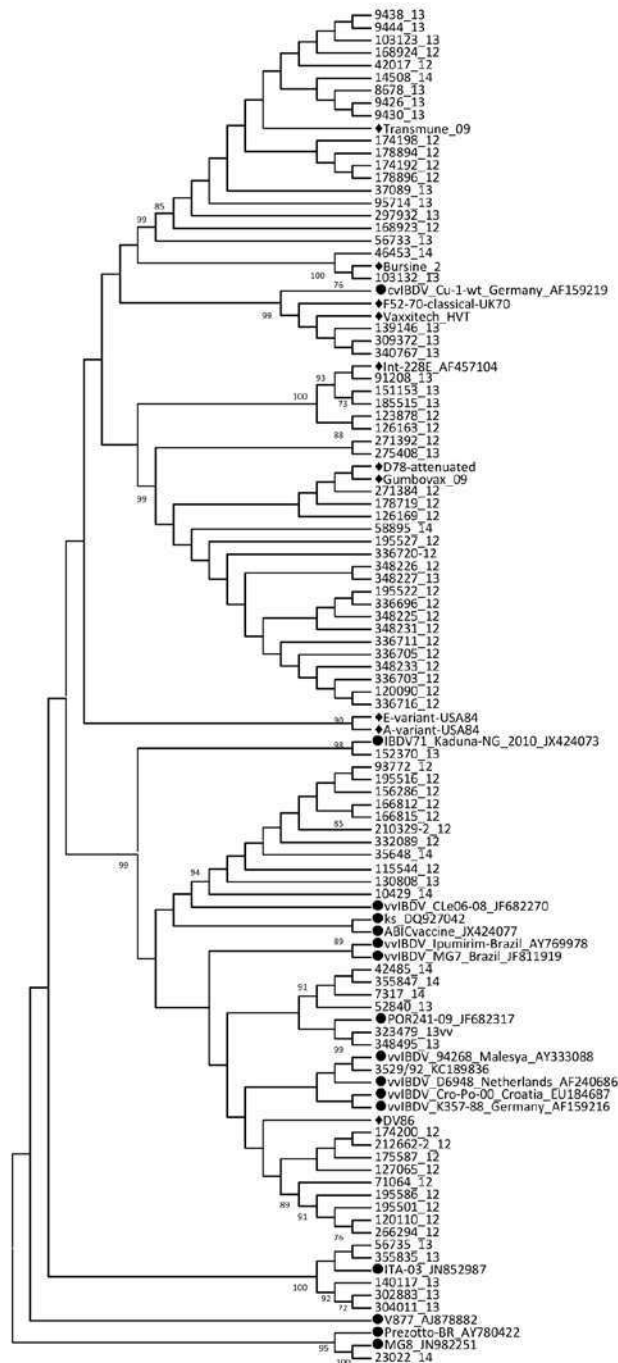
I risultati dell'attività di sequenziamento dei 52 ceppi provenienti da Paesi esteri sono riportati nella Tabella n.2. L'analisi molecolare ha messo in evidenza che 31 virus hanno presentato una maggiore omologia nei confronti del ceppo vvDV86; 11 virus verso i ceppi vaccinali ( V78 vaccine, Transmune; Vaxxitek) e 10 ceppi verso vari ceppi vv ( CLe 06-08, V887, MG8, ANA Prezzotto-Brasilian, Ks,3529/92).

**Tabella 2-**risultati del sequenziamento di 52 ceppi di IBDV campionati in 15 Paesi Esteri

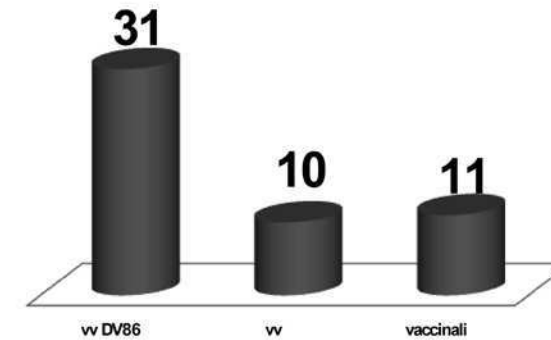
	Paesi esteri Anni 2012-2013	campione	risultati sequenziamento	N° Darwin/IZSLER
1	Federazione Russa	FTA cards	91,3% 228E	104708/2012
2	Federazione russa	FTA cards	97% V78/ABIC vaccine in blast	124021/2013
3	Federazione Russa	FTA cards	97% V78/ABIC vaccine in blast	124034/2013
4	Federazione Russa	FTA cards	90,9% DV86	175029/2013
5	Federazione Russa	FTA cards	90,8% DV86	175040/2013
6	Federazione Russa	FTA cards	97,6% DV86	256464/2013
7	Federazione Russa	FTA cards	97,6% DV86	256466/2013
8	Federazione Russa	FTA cards	95,7% DV86	256468/2013
9	Ungheria	Borsa	99,4% Transmune	184928/2012
10	Ungheria	borsa	98,8% DV86	44434/2013
11	Ucraina	borsa	99% VT877 due virus	201899/2012
12	Ucraina	FTA cards	100% Transmune	341351/2012
13	Ucraina	FTA cards	96% DV86 e 98% ceppo CLE 06-08 in blast	241238/2013
14	Ucraina	FTA cards	96% DV86 e 98% ceppo CLE 06-08 in blast	245407/2013
15	Ucraina	FTA cards	99% V887	317459/2013
16	Regno Unito	FTA cards	99,8% Transmune	324185/2012
17	Regno Unito	FTA cards	100% Transmune	324193/2012
18	Regno Unito	FTA cards	96,5% DV86	324223/2012
19	Olanda	FTA cards	99,4% DV86	341442/2012
20	Olanda	FTA cards	99,2% DV86	341442/2012
21	Serbia	borsa	97,9% DV86	51494/2013
22	Rep.Ceca	borsa	99,6% DV86	77185/2013
23	Giordania	FTA cards	96,5% DV86	78796/2013
24	Giordania	FTA cards	96,6% DV86	78814/2013
25	Giordania	FTA cards	96,4% DV86 4 virus	165765/2013
26	Giordania	FTA cards	97% POR241/09 (JF682317) in blast	200559/2013
27	Giordania	FTA cards	97,6% DV86	340833/2013
28	Giordania	FTA cards	95,7% DV86	340844/2013
29	Giordania	FTA cards	98% ceppo CLe 06-08 in blast	3113/2014
30	Giordania	FTA cards	98% ceppo CLe 06-08 in blast	3125/2014
31	Giordania	FTA cards	98% ceppo CLe 06-08 in blast	3136/2014
32	Libano	FTA cards	94,9% DV86	78846/2013
33	Libano	FTA cards	96,1% DV86	78850/2013
34	Libano	FTA cards	95,7% DV86	78854/2013
35	Emirati Arabi	FTA cards	96% MG8	98711/2013
36	Emirati Arabi	FTA cards	96% MG8	98713/2013
37	Malta	borsa	95% ceppo ANAY780422 Prezotto-Brasilian	123940/2013
38	Arabia Saudita	FTA cards	97,2% Trasmune	134587/2013
39	Arabia Saudita	FTA cards	96,3% DV86	262559/2013
40	Arabia Saudita	FTA cards	96% MG8 (JN982251) in blast	358809/2013
41	Arabia Saudita	FTA cards	97% ceppo Ks in blast	358812/2013
42	Tunisia	FTA cards	98% DV86	248344/2013
43	Tunisia	FTA cards	97% DV86	248367/2013
44	Tunisia	FTA cards	97,9% DV86	248378/2013
45	Tunisia	FTA cards	98% DV86	22314/2014
46	Tunisia	FTA cards	98,1% DV86	22315/2014
47	Tunisia	FTA cards	98% DV86	22316/2014
48	Tunisia	FTA cards	97,3% DV86 e 98% 3529/92	36209/2014
49	Tunisia	FTA cards	97,3 DV86 e 98% 3529/92	36211/2014
50	Marocco	FTA cards	100% Vaxxitek	5270/2014
51	Marocco	FTA cards	100% Vaxxitek	11682/2014
52	Camerun	FTA cards	97,5% DV86 2 virus	153384/2014

In Figura n.4 è rappresentato l'albero filogenetico dei ceppi dei Paesi Esteri

**Figura 4:** dendrogramma costruito con il metodo neighbour-joining basato sulla sequenza parziale del gene VP2 dei ceppi di IBDV campionati in paesi Esteri oggetto dello studio. I ceppi sono confrontati con le sequenze del pannello di virus utilizzati come riferimento nell'analisi di routine (♦) e con ceppi disponibili in GeneBank (●)



**Figura 5:** risultato della genotipizzazione dei ceppi IBDV dei Paesi esteri: 31 ceppi vv DV86, 11 ceppi vaccinali, 10 ceppi vv vari



## DISCUSSIONE

I risultati dell'indagine molecolare dei virus italiani mostrano una diffusione dei virus very virulent in zone geografiche ben definite che riguardano in particolare la Romagna, le Marche, qualche provincia della Sicilia e del Veneto. I virus varianti very virulent sono risultati il 28,26 % e in Romagna i virus "very virulent" sono risultati il 30,7% dei virus isolati. Tutti i virus identificati in Lombardia sono risultati essere ceppi vaccinali (mild e intermediate). Quattro dei virus di campo isolati sono risultati essere simili (omologia del 99%) al virus variante "non virulent" IT03 già segnalato da Bonci et al. nel 2012, di cui 3 identificati in Romagna ed 1 in Veneto. Questi virus non provocano la malattia manifesta ma possono causare lesioni microscopiche alla borsa di Fabrizio ed indurre immunodepressione. Questi virus, inoltre, in quanto varianti, possono eludere l'immunità indotta dalla vaccinazione. Dall'analisi filogenetica risulta che questi quattro virus clusterizzano con il virus IT03 e formano un cluster distinto rispetto agli altri ceppi.

I risultati dell'indagine molecolare condotta su virus isolati da campioni provenienti da Paesi Esteri ci hanno mostrato una altissima prevalenza dei virus "very virulent" con una percentuale dell'82,3%.

I virus "very virulent" sono distribuiti invariabilmente in tutti i paesi controllati: dall'Est Europa, alla Russia, ai Paesi Arabi fino al Nord Africa e paesi del bacino del Mediterraneo.

## CONCLUSIONI

Lo studio presentato ha riguardato la raccolta dei campioni, l'identificazione ed il sequenziamento di 144 ceppi di virus IBDV nell'arco temporale degli ultimi due anni. Di questi 92 ceppi virali erano di origine italiana e 52 di origine da Paesi Esteri. Risulta interessante osservare che circa un terzo dei virus italiani sono "very virulent". Quattro virus, invece, sono risultati essere varianti "non virulent" omologhi per il 99% al virus IT03. Questi tipi virali vanno tenuti in osservazione perché possono eludere l'immunità indotta dai vaccini e determinare problemi di immunodepressione. I restanti virus sono risultati virus vaccinali.

Per quanto riguarda i 52 virus dei Paesi Esteri si osserva come sono fortemente prevalenti i virus “very virulent” rispetto ai ceppi vaccinali. Questo, epidemiologicamente, indica che nei Paesi vicini il virus “vv” della Malattia di Gumboro è altamente presente per cui, nel nostro Paese, risulta di fondamentale importanza continuare ad eseguire una attenta biosicurezza e profilassi vaccinale. In conclusione i test diagnostici che possono identificare i ceppi IBVD classici o varianti, patogeni o non patogeni, sono necessari ai fini della valutazione della diffusione di questo virus nel tempo e per aree geografiche con lo scopo di modularne le strategie di profilassi ( Mahgoub et al., 2012).

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonci M., Giovanardi D., Pesente P., Morandini E., Lupini C., Cecchinato M., Rossi G., Catelli E. (2012). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della Bursite Infettiva isolati recentemente in Italia. Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 2013.
2. -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 virus. *Cell*. 120:761-772.
3. Etteradossi, N., Rivallan, G., Toquin, D. & Guittet, M. (1997b). Limited antigenic variation among recent infectious bursal disease virus isolates from France. *Arch Virol* 142, 2079–2087
4. Jackwood D.J., Sommer-Wagner S.E. (2011). Amino acid contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology* 409:33-37.
5. Lukert P.D., Saif Y.M. (1997) Infectious bursal disease. *Disease of Poultry* 10<sup>th</sup> (pp.721-738). Ames: Iowa State University Press.
6. Mahgoub HA., Bailey M., Kaiser P. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Arch. Virol.* 11:2047-57.
7. Moreno Martin A., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Etteradossi N., Ceruti R., Cordioli P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease virus isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Dis.* 51:863-872.
8. Moreno Martin A., Barbieri I., Ceruti R., Morandini E., Cordioli P. (2010). Caratterizzazione genomica di ceppi di virus della malattia di Gumboro isolati in Italia nel periodo 2006-2009. Atti della Società Italiana di Patologia Aviare 201, pp.199-203.
9. Muller H., Scholtissek C., Becht H. (1979). The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 3, 584-589.
10. Seahorn H., Hofacre C. (2011) *The Poultry Informed professional* 120:1-8-
11. Vakharia V.N., Ahamed B., Snyder D.B. (1994) Molecular basis of antigenic variation infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 31, 265-273.
12. Van den Berg T.P. (2000). Acute Infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathology*, 29, 175-194.
13. Van den Berg T.P., Etteradossi N., Toquin D., Meulemans G. (2000). Infectious Bursal Disease (Gumboro Disease). *Disease of Poultry: World trade and Public Health Implication. OIE Scientific and Technical Review* (pp.509-543) Paris, France.

14. Von Einem U.I., Gorbalenya A.E., Schirmeier H., Behrens S.E., Letzel T., Mundt E. (2004). VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 85, 2221-2229.
15. Woolfe A. et al. (2005) *PloS Biology* 3:116-130

Si ringraziano i tecnici della Sezione di Forlì e del reparto “sequenziamento” della sede IZSLER in Brescia per la preziosa collaborazione.