

DATI EPIDEMIOLOGICI SULLA CIRCOLAZIONE IN ITALIA DEL NUOVO GENOTIPO IBDV ITA

Lupini C.¹, Felice V.¹, Bonci M.¹, Listorti V.¹, Laconi A.¹, Cecchinato M.², Morandini E.³, Catelli E.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – Italia*

² *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italia*

³ *Agricola Tre Valli, Via Valpantena, 18/G, 37138 Quinto di Valpantena (VR), Italia*

Summary

Significant economic losses can affect the poultry industry due to the consequences of immunosuppression induced by viral infections. This study reports the results of a survey, conducted in 2012-2014 on 59 farms located in Northern and Central Italy, aimed to investigate the diffusion of the new genotype ITA of infectious bursal disease virus (IBDV) recently detected in Italy. All flocks, out of one, were vaccinated for IBD. Seventeen longitudinal studies and 42 “one off” sampling performed during routine diagnostic activity for IBD, were performed. Samples of the Bursa of Fabricius were collected for virus detection by a RT-PCR protocol designed in the hypervariable region of the VP2, from 10 birds per flock, at different time of life. The RT-PCR products were sequenced and the sequences aligned with the available database logged homologous sequences. The IBDV strain ITA was the most detected genotype, being found in 31 out of 59 farms. The actual pathogenicity of the IBDV ITA strain, as well as the degree of protection offered by common vaccination schedules, will be further investigated

INTRODUZIONE

Le Bursite infettiva (IBD) è una malattia immunosoppressiva del pollo caratterizzata dall'interessamento dei linfociti B e della borsa di Fabrizio dove causa necrosi e deplezione linfocitaria (Etteradossi e Saif, 2013). L'impatto economico di questa malattia è notevole, legato alla mortalità, alle perdite produttive ed all'immunosoppressione che rende gli animali più sensibili a un gran numero di patologie, fra cui le colisetticemie, e riduce l'efficacia delle vaccinazioni (Van Den Berg, 2000). L'agente eziologico è un *Avibirnavirus* (IBDV), virus a RNA a doppia elica, caratterizzato da una notevole variabilità sia in termini antigenici sia di virulenza. Esistono, infatti, sia ceppi in grado di dare forme cliniche gravi, accompagnate da notevole mortalità ed immunosoppressione che ceppi causa di forme subcliniche, dove l'esito unico dell'infezione è l'immunosoppressione. L'insorgenza di nuove varianti è un evento comune per questo virus, esito dell'occorrenza e dell'accumularsi nel genoma di mutazioni in punti chiave per la virulenza o per l'antigenicità, anche a seguito della pressione selettiva esercitata dalla vaccinazione di massa (Etteradossi e Saif, 2013). La proteina del capsido VP2 è considerata la sede principale sia dei siti antigenici riconosciuti dagli anticorpi neutralizzanti che di quelli fondamentali per la

virulenza ed il tropismo cellulare. Dopo la sua prima comparsa negli anni '60 negli USA (Cosgrove, 1962), la Bursite Infettiva si è diffusa a livello mondiale ed è stata adeguatamente controllata con vaccini classici sino alla fine degli anni '80, quando il panorama mondiale si è modificato sia per la comparsa di varianti antigeniche subcliniche negli USA (Rosenbeger e Cloud, 1986), che per la diffusione di ceppi a elevata virulenza in Europa (vvIBDV) (Van Den Berg *et al.*, 1991). In Italia i ceppi vvIBDV hanno causato negli ultimi anni gravi danni al patrimonio avicolo (Moreno *et al.*, 2007, Moreno *et al.*, 2010), e solo l'introduzione sul mercato di vaccini di nuova generazione (ricombinanti o ad immunocomplessi) ne ha permesso il controllo. Scarsi o addirittura assenti sono invece nel nostro Paese i dati sulla diffusione e sull'impatto economico delle forme subcliniche di IBD. Recentemente è stata svolta un'indagine mediante RT-PCR per IBDV in alcuni allevamenti di polli da carne affetti da ripetuti casi di colisetticemia, vaccinati per IBDV (Bonci *et al.*, 2013). L'indagine ha permesso di evidenziare 4 ceppi di IBDV (denominati ITA01, ITA02, ITA03, ITA04) la cui analisi di sequenza a livello della proteina VP2, ha evidenziato un genotipo dalle caratteristiche uniche, diverse da tutti i ceppi presenti in *GenBank*. Con ogni probabilità si tratta di una variante nuova, in grado di eludere la protezione dei vaccini in uso. Il rinvenimento della variante in allevamenti affetti da infezioni batteriche ripetute fa pensare che essa causi forme subcliniche immunosoppressive, analoghe a quelle osservate negli USA.

Allo scopo di delineare un quadro della situazione di campo il più possibile aderente alla realtà, è stata svolta sul territorio nazionale, in particolare nelle aree a rischio d'infezione, un'indagine sulla diffusione del genotipo ITA nell'allevamento del broiler. Il progetto ha previsto studi longitudinali e campionamenti singoli, per la ricerca di IBDV mediante RT-PCR. I ceppi evidenziati sono stati caratterizzati mediante analisi di sequenza della regione ipervariabile della proteina VP2. Dove possibile i risultati sono stati integrati con i dati produttivi d'allevamento ed i piani vaccinali applicati.

MATERIALI E METODI

Allevamenti

Lo studio è stato svolto in allevamenti di broiler situati in Veneto, Lombardia, Emilia Romagna e Marche in un periodo compreso fra Ottobre 2012 e Dicembre 2014. Per ogni allevamento, quando possibile, veniva compilata una scheda in cui venivano riportati: le vaccinazioni eseguite per IBDV, l'eventuale sintomatologia clinica pregressa o in atto e i dati produttivi di allevamento.

Campionamento

In 17 allevamenti sono stati eseguiti studi longitudinali. A cadenza settimanale, 10 soggetti per gruppo sono stati sacrificati e sottoposti ad esame necroscopico, durante il quale è stata prelevata la borsa di Fabrizio per indagini diagnostiche molecolari. I campioni sono stati processati in *pool* per data di campionamento e per allevamento. Gli animali e la rispettiva Borsa di Fabrizio sono stati pesati per il calcolo del *Bursal Index*.

Il resto degli allevamenti (42) sono stati campionati durante indagini cliniche e necroscopiche di *routine*, in caso di sospetto di Bursite Infettiva.

Bursal index

Il calcolo del *Bursal Index* (BI) è stato eseguito secondo la seguente formula: peso della Borsa di Fabrizio/peso della carcassa x 100.

Estrazione dell'RNA virale ed RT-PCR

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). 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.

Sequenziamento ed analisi di sequenza

I prodotti amplificati sono stati sequenziati, in entrambe le direzioni, presso il centro di sequenziamento MacroGen Europe (Amsterdam). Le sequenze nucleotidiche sono state elaborate con il software Bioedit ed allineate e confrontate, utilizzando il software Clustal W, alle sequenze del gene della VP2 di ceppi di IBDV di riferimento (compresi i ceppi vaccinali) presenti in *GenBank*.

RISULTATI E DISCUSSIONI

I risultati dello studio dimostrano un'elevata diffusione dell'infezione da IBDV negli allevamenti campionati. I ceppi evidenziati appartengono a diversi genotipi e **ciò concorda con i dati** ad oggi disponibili sulla situazione epidemiologica nazionale (Moreno *et al.*, 2007; Massi *et al.*, 2014).

Nei campionamenti singoli, eseguiti tutti nel periodo 2013-2014, sono stati evidenziati 42 ceppi di IBDV; l'analisi di sequenza ha permesso di evidenziare che: 12 ceppi mostravano la più alta % di omologia (97-100%) con ceppi vaccinali, 4 con ceppi *very virulent*, 1 ceppo con il ceppo classico HPR2 ma la maggior parte (28 su 42) con il genotipo ITA. Quest'ultimo genotipo è stato evidenziato in allevamenti in cui erano applicati diversi programmi vaccinali.

Seppur con frequenze diverse, gli studi longitudinali (Tabelle 1 e 2) hanno permesso di evidenziare gli stessi genotipi dei campionamenti singoli. Ceppi di origine vaccinale sono stati rinvenuti da 19 a 46 giorni di vita; in questi allevamenti la vaccinazione era stata eseguita in incubatoio o in allevamento a 14-18 giorni di vita. Il nuovo genotipo ITA è stato evidenziato in 3 allevamenti. Nell'allevamento 6 è **stato possibile evidenziarlo** solo al 35° giorno di vita. All'esame necroscopico 5 dei 10 soggetti campionati in questo allevamento presentavano atrofia della borsa. Inoltre venivano riportate enterite catarrale e coccidiosi cecale. Questi dati, associati ad una % percentuale di mortalità che non si discosta dal valore atteso, farebbero supporre un andamento subclinico della infezione da IBDV del genotipo ITA. Il genotipo ITA è stato inoltre rilevato negli allevamenti 11 e 12; nel primo caso nel gruppo campionato non

sono stati riportati particolari problemi, nel secondo caso, invece, gli animali mostravano grave enterite, fragilità ossea e performances scadenti che, associate ad elevata mortalità, hanno costretto alla macellazione anticipata del gruppo.

CONCLUSIONI

Lo studio ha evidenziato un'ampia diffusione a livello nazionale del genotipo IBDV ITA in broiler regolarmente vaccinati. Vista la notevole variabilità di sintomatologia e performances produttive osservate negli allevamenti positivi ad ITA, rimane ancora non chiaro il grado di patogenicità di questo ceppo. Per ottenere dati definitivi a riguardo sarà necessario svolgere uno studio di patogenicità in condizioni d'isolamento biologico per eliminare tutte le variabili (di natura ambientale, microbiologica, alimentare ecc.) che in condizioni di campo, nei casi spontanei di malattia, alterano il quadro determinato dal virus.

Al fine di attuare piani vaccinali più efficaci, sarà inoltre opportuna la valutazione sperimentale della protezione conferita nei riguardi del genotipo ITA dai vaccini di più comune impiego nella profilassi della Bursite infettiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonci M, Giovanardi D, Pesente P, Morandini E, Lupini C, Cecchinato M, Rossi G, Catelli E. (2013) Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della Bursite Infettiva isolati recentemente in Italia. Atti 52° Convegno Annuale SIPA Forlì 11-12 Aprile 2013 - pp. 136-144.
2. Cosgrove AS (1962) An Apparently New Disease of Chickens: Avian Nephrosis. *Avian Diseases* 6: 385-389.
3. Eterradossi N, Saif YM (2013) Infectious Bursal Disease in “Disease of Poultry – 13th edition” chapter 7, Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Venugopal N. – Wiley-Blackwell by John Wiley & Sons, Inc. AAAP, Ames, Iowa. pp 219-246.
4. Jackwood DJ, Cookson KC, Sommer-Wagner SE, Le Galludec H, JJ de Wit (2006) Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe, *Avian Diseases* 50: 532-536.
5. Massi P, Fiorentini L, Barbieri I, Casadio M, Tosi G (2014) 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. Atti 53° Convegno Annuale SIPA Salsomaggiore Terme (PR) 8 - 9 Maggio 2014 - pp. 155-167.
6. Moreno AM, Fallacara F, Barbieri I, Tosi G, Rivallan G, Eterradossi N, Ceruti R, Cordioli P (2007) Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005”, *Avian Diseases* 51: 863-872.

7. Moreno A, Barbieri I, Ceruti R, Morandini E, P Cordioli (2010) Caratterizzazione genomica di ceppi del virus della malattia di Gumboro isolati in Italia nel periodo 2006-2009. Atti 49° Convegno Annuale SIPA 2010, Forlì 29-30 Aprile 2010 - pp. 199-203.
8. Rosenberger J, SS Cloud (1986) Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses, *Journal American Veterinary Medical Association* 189: 357 [abst.].
9. Van den Berg TP (2000) Acute Infectious bursal disease in poultry: A review, *Avian Pathology* 29: 175-194.
10. Van Den Berg TP, Gonze M. & G. Meulemans (1991) Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterization of a highly virulent strain, *Avian Pathology* 20: 133-143.

Tabella 1. Risultati degli studi longitudinali effettuati in Veneto e Lombardia per ricerca di IBDV.

Allevamento	Regione	Vaccinazione (età gg)	RT-PCR (genotipo)		Bursal Index (%) [§]		Dati produttivi		
			19-21gg	32-35gg	19-21gg	32-35gg	Mortalità (%)	IC	Scarto al macello (%)
1	Veneto	Incubatoio	-	+vac	14	7	4,80	1,93	0,89
2	Veneto	Intermedio (14)	-	+vac	13	6	4,54	1,90	1,85
3	Veneto	Intermedio (14)	-	+vv	14	5	6,70	1,80	Nd
4	Lombardia	Intermedio (18)	-	-	20	5	4,43	1,79	0,77
5	Lombardia	Incubatoio	+vac	+vac	13	6	5,69	1,75	1,34
6	Lombardia	Intermedio (14)	-	+ITA	20	18	4,72	1,80	0,30

[§]media di 10 soggetti

- negativo a RT-PCR per IBDV

+ positivo a RT-PCR per IBDV

vac = massima omologia al sequenziamento con ceppo vaccinale;

vv = massima omologia al sequenziamento con ceppo *very virulent*;

ITA = massima omologia al sequenziamento con genotipo ITA

IC = indice di conversione

Tabella 2. Risultati degli studi longitudinali effettuati in Marche ed Emilia Romagna per ricerca di IBDV.

Allevamento	Regione	Vaccinazione	RT-PCR(genotipo)				
			13-16gg	20-22gg	24-29gg	32-38gg	43-46gg
7	Emilia Romagna	Incubatoio	-	-	+vv	+vv	-
8	Emilia Romagna	Intermedio (18gg)	-	+non seq	-	+vac	-
9	Emilia Romagna	Intermedio (14gg)	-	-	-	+vac	-
10	Emilia Romagna	Incubatoio	+non seq	-	-	+vv	-
11	Emilia Romagna	Intermedio (14gg)	-	-	+ITA	-	-
12	Emilia Romagna	Incubatoio	-	+ITA	+ITA	-	n.e.
13	Marche	n.d.	-	-	+vac	+vv	+vac
14	Marche	Incubatoio	-	-	+clas	+non seq	+clas
15	Marche	Intermedio (in allev)	-	-	+clas	+clas	-
16	Marche	Incubatoio	-	-	-	-	-
17	Marche	Incubatoio	-	-	+clas	+clas	-

- Negativo a RT-PCR per IBDV

+ positivo a RT-PCR per IBDV

Non seq= prodotto non sequenziabile

n.e.= campionamento non eseguito

vac=massima omologia al sequenziamento con ceppo vaccinale;

vv= massima omologia al sequenziamento con ceppo *very virulent*;

ITA= massima omologia al sequenziamento con genotipo ITA

clas= massima omologia al sequenziamento con genotipo classico