

## ANALISI DELLA SEQUENZA COMPLETA DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO ITA

Felice V.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>, Bonci M.<sup>1</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Giovanardi D.<sup>3</sup>, Pesente P.<sup>3</sup>, Mescolini G.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Silveira F.<sup>1</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup> Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5, 37132, San Michele Extra (VR), Italia

### Summary

The full-length genome of an Italian IBDV strain (ITA) was sequenced and compared with available full length IBDV sequences.

Amino acid residues previously observed in *very virulent* IBDV strains, as well as amino acid residues typical of non-virulent IBDV strains, were observed in the amino acid sequence of the ITA strain.

By the phylogenetic analysis, ITA strain did not show a close relationship with other known IBDV strains, neither recombination or reassortment events.

The currently available molecular data confirmed that ITA strain is a new genotype. Further investigations are needed to clarify its origin.

### INTRODUZIONE

*Infectious bursal disease virus* (IBDV) è l'agente eziologico della Bursite infettiva, malattia cosmopolita immunosoppressiva del pollo, ad alta contagiosità e impatto socio-economico elevato, a causa dell'aumentata sensibilità alle infezioni secondarie e alla risposta sub-ottimale alle vaccinazioni di routine. Si conoscono due sierotipi di IBDV, dei quali solo il sierotipo 1 è patogeno e distinto, in base al diverso grado di patogenicità e alle caratteristiche antigeniche, nei seguenti patotipi: classici, varianti, *very virulent* (vv), attenuati (Etteradossi & Saif, 2013). Dal punto di vista tassonomico, IBDV si inquadra nella famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*. È caratterizzato da simmetria icosaedrica e privo di *envelope*, presenta un diametro variabile di 55-65 nm. Il genoma di IBDV è costituito da due segmenti di RNA a doppio filamento, il segmento A (3300 bp) e il segmento B (2800 bp). Il segmento A comprende due *open reading frames* (ORFs) parzialmente sovrapposte: ORF1 codifica la proteina non strutturale VP5 di 145 amminoacidi (aa) potenzialmente coinvolta nel processo di apoptosi virale (Carballeda *et al.*, 2015), ORF2 codifica una poliproteina (1012 aa), autoclivata nelle due principali proteine strutturali VP2 (1-512 aa) e VP3 (756-1012 aa) e nella proteasi VP4 (513-755 aa). La proteina VP2 è responsabile della produzione di anticorpi neutralizzanti, in quanto principale immunogeno. La proteina VP3 forma lo strato più interno del capsido, interagisce con VP1 e con il genoma ed è coinvolta nella replicazione e nell'assemblaggio virale (Deng *et al.*, 2007). La proteina non strutturale VP4 è una proteasi responsabile dell'autoprocessazione della poliproteina in VP2, VP4 e VP3 (Li *et al.*, 2012). Il segmento B codifica la polimerasi virale VP1 (1-879 aa), implicata in diversi eventi, quali replicazione virale, sintesi dell'RNA messaggero e incapsidamento,

conseguente all'interazione con VP3 (Lombardo *et al.*, 1999).

IBDV è soggetto a mutazioni, quali sostituzioni, inserzioni, delezioni e/o riassortimento genico che hanno portato all'evidenza di nuove varianti. A questo proposito, un emergente genotipo, denominato ITA, è stato recentemente segnalato in Italia. L'analisi filogenetica della regione ipervariabile della proteina VP2, ha mostrato che il ceppo ITA clusterizza separatamente, rispetto ai ceppi IBDV di referenza (Lupini *et al.*, 2016).

La sequenza parziale di un isolato non sempre risulta sufficientemente esaustiva ai fini della sua classificazione (Petkov *et al.*, 2007). Scopo del presente studio è stato quello di sequenziare l'intero genoma del ceppo ITA, al fine di completare la sua caratterizzazione molecolare e formulare ipotesi relative alla sua origine.

## MATERIALI E METODI

### *Virus*

Il ceppo ITA è stato coltivato in uova *Specific Pathogen Free* (SPF), secondo il protocollo di Rosenberger *et al.* (2009).

### *Estrazione dell'RNA virale e Reverse Transcriptase-PCR*

L'estrazione dell'RNA virale è stata effettuata a partire dall'omogenato degli embrioni precedentemente inoculati, utilizzando un kit del commercio (QIAamp® Viral RNA Mini kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conformemente alle istruzioni della Ditta produttrice.

I segmenti genomici A e B erano amplificati seguendo il protocollo di Jackwood *et al.* (2006), modificato.

### *Sequenziamento*

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Milano, Italia), seguendo le istruzioni fornite dalla Ditta produttrice e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Bio-Fab Research, Roma, Italia).

### *Analisi filogenetica*

Le sequenze nucleotidiche e amminoacidiche dei segmenti A e B sono state elaborate mediante il *software* Bioedit, allineate e confrontate con le sequenze di ceppi IBDV presenti nel database *GenBank*, utilizzando il programma Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Gli allineamenti sono stati eseguiti sia per ogni singolo segmento separatamente, sia per la concatenazione dei due utilizzando MAFFT (Katoh & Standley, 2013). Un network filogenetico basato sull'intero genoma è stato ricostruito mediante l'algoritmo NeighborNet implementato in SplitsTree4v4.12.3 (Huson & Bryant, 2010) ed è stata testata la presenza di eventi di ricombinazione all'interno dei dataset usando il Phi test. L'analisi di ricombinazione è stata inoltre eseguita su tutti i dataset usando RDP4 (Martin *et al.*, 2010). I parametri sono stati impostati seguendo il manuale RDP4. La presenza di *breakpoint* di ricombinazione è stata anche valutata usando GARD (Kosakovsky *et al.*, 2006). Gli alberi filogenetici sono stati ricostruiti a partire dai tratti non ricombinanti utilizzando un approccio di Maximum Likelihood (ML)

implementato in PhyML. Infine, un albero filogenetico è stato ricostruito usando Fasttree (Price *et al.*, 2010) a partire da una dataset di 1149 sequenze parziali di VP2. Per motivi di calcolo il database è stato ridotto eliminando le sequenze identiche.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi delle sequenze amminoacidiche del ceppo ITA ha evidenziato residui precedentemente descritti come *marker* di virulenza o evidenziati in ceppi virulenti (Petkov *et al.*, 2007; Lazarus *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2014; Lupini *et al.*, 2016), residui riportati in ceppi IBDV *non-virulent* o a ridotta virulenza (Wang *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2013) e residui peculiari del ceppo ITA.

Per quanto riguarda i *marker* di virulenza, il ceppo ITA mostrava triptofano-137 nella VP5 e prolina-527 nella VP4.

Relativamente ai residui aa comuni a ceppi *v*IBDV, il ceppo ITA mostrava nella proteina VP1 treonina, acido glutammico e glicina alle posizioni 145-146-147. Come precedentemente riportato (Lupini *et al.*, 2016), il ceppo ITA mostrava nella proteina VP2 una regione eptapeptidica ricca in serina precedentemente descritta in ceppi *v*IBDV e gli aa Glutamina, Treonina e Glicina rispettivamente alle posizioni 249, 286 e 318, caratteristici dei ceppi classici.

Relativamente ai residui aa comuni a ceppi IBDV *non-virulent* o a ridotta virulenza, il ceppo ITA mostrava isoleucina-78 nella proteina VP5, alanina-990 e treonina-1005 nella proteina VP4 e isoleucina-4 nella proteina VP1.

Fenilalanina e arginina, alle posizioni 413 e 756, rispettivamente, della proteina VP1, sono state evidenziate quali caratteristiche peculiari del ceppo ITA.

Nell'analisi filogenetica sono stati analizzati complessivamente 47 genomi e il ceppo ITA ha mostrato una distanza genetica tra 0,044-0,168, 0,040-0,120 e 0,043-0,124 rispettivamente per il segmento A, per il segmento B e per il genoma completo. La presenza di alcune reticolazioni nel network filogenetico e i risultati Phi test fanno ipotizzare la presenza di frequenti eventi di ricombinazione/riassortimento tra i ceppi IBDV presi in esame. L'analisi RDP e GARD ha confermato questi risultati. Gli eventi di riassortimento e ricombinazione risultavano essere frequenti, sebbene nessuno di questi abbia interessato il ceppo ITA (Figura 1). In particolare, il riassortimento era evidenziato in 25 dei 47 ceppi analizzati, mentre la ricombinazione era evidenziata solo all'interno del segmento A, dove 21 ceppi mostravano un inserto di ricombinazione tra le posizioni 1169 e 1456. Solo due ceppi facevano eccezione, EU595670 (punti di ricombinazione 1-1351) nel segmento A e KC109816 (punti di ricombinazione 437-2087) nel segmento B. Poiché il numero delle sequenze complete dei genomi disponibili è limitato, i risultati qui descritti potrebbero non essere definitivi, così come la definizione degli *hot-spots* di ricombinazione. Gli alberi filogenetici confermavano l'assenza di una stretta relazione tra ITA e altri ceppi disponibili nelle banche dati. L'analisi dell'albero filogenetico del segmento A, dove il sierotipo 1 e 2 sono più divergenti, evidenziava che ITA, rispetto ad altri genotipi, è più vicino ai ceppi del sierotipo 2 (Figura 2). È quindi possibile ipotizzare che ITA sia un discendente di un gruppo originato in un passato remoto. Questi risultati sono stati confermati anche dall'analisi dell'albero filogenetico, basato su un elevato numero (i.e. 1149) di sequenze parziali della proteina VP2.

Possiamo quindi concludere che, all'analisi dell'intero genoma, il ceppo ITA si conferma essere un isolato IBDV geneticamente unico.

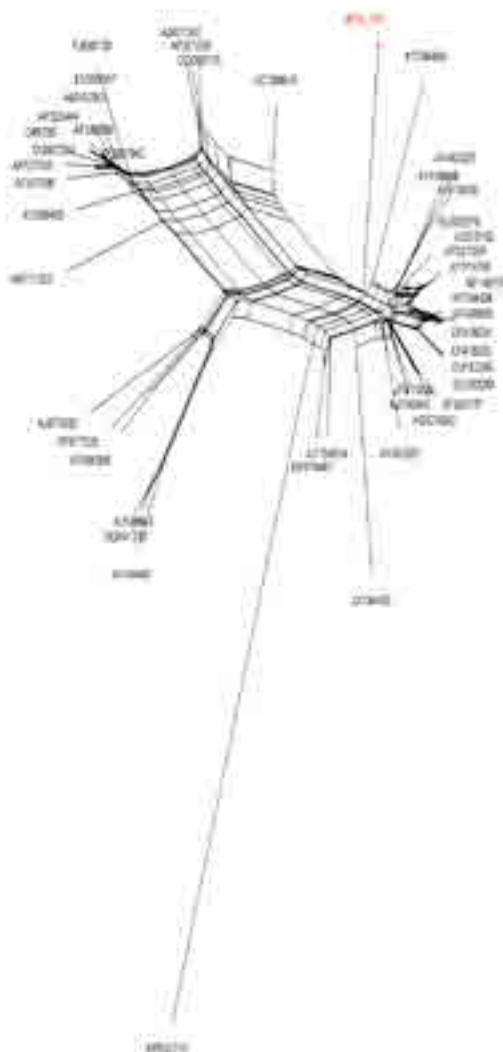
Il principale meccanismo di evoluzione dei virus a RNA è il loro alto tasso di sostituzione, che può causare emergenza di nuovi ceppi IBDV, in grado di superare l'immunità vaccinale (Etteradossi & Saif, 2013), come già evidenziato in altri virus a RNA (Catelli *et al.*, 2010). Eventi di ricombinazione omologa (He *et al.*, 2009; Jackwood, 2012) e fenomeni di riassortimento, possono avvenire naturalmente tra diversi ceppi IBDV (Wei *et al.*, 2006; Kasanga *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2013), ma il ceppo ITA non sembra essere coinvolto, lasciando aperti numerosi interrogativi sulla sua origine. La sequenza amminoacidica del ceppo ITA condivide residui aa con ceppi IBDV virulenti così come presenta aa già considerati *marker* di virulenza, soprattutto all'interno della proteina VP1. Tuttavia, l'analisi di sequenza ha evidenziato anche residui caratteristici di ceppi IBDV a minor grado di virulenza. Successivi studi di patogenicità *in vivo* sembrano necessari, allo scopo di meglio definire virulenza e patogenicità del ceppo ITA.

## BIBLIOGRAFIA

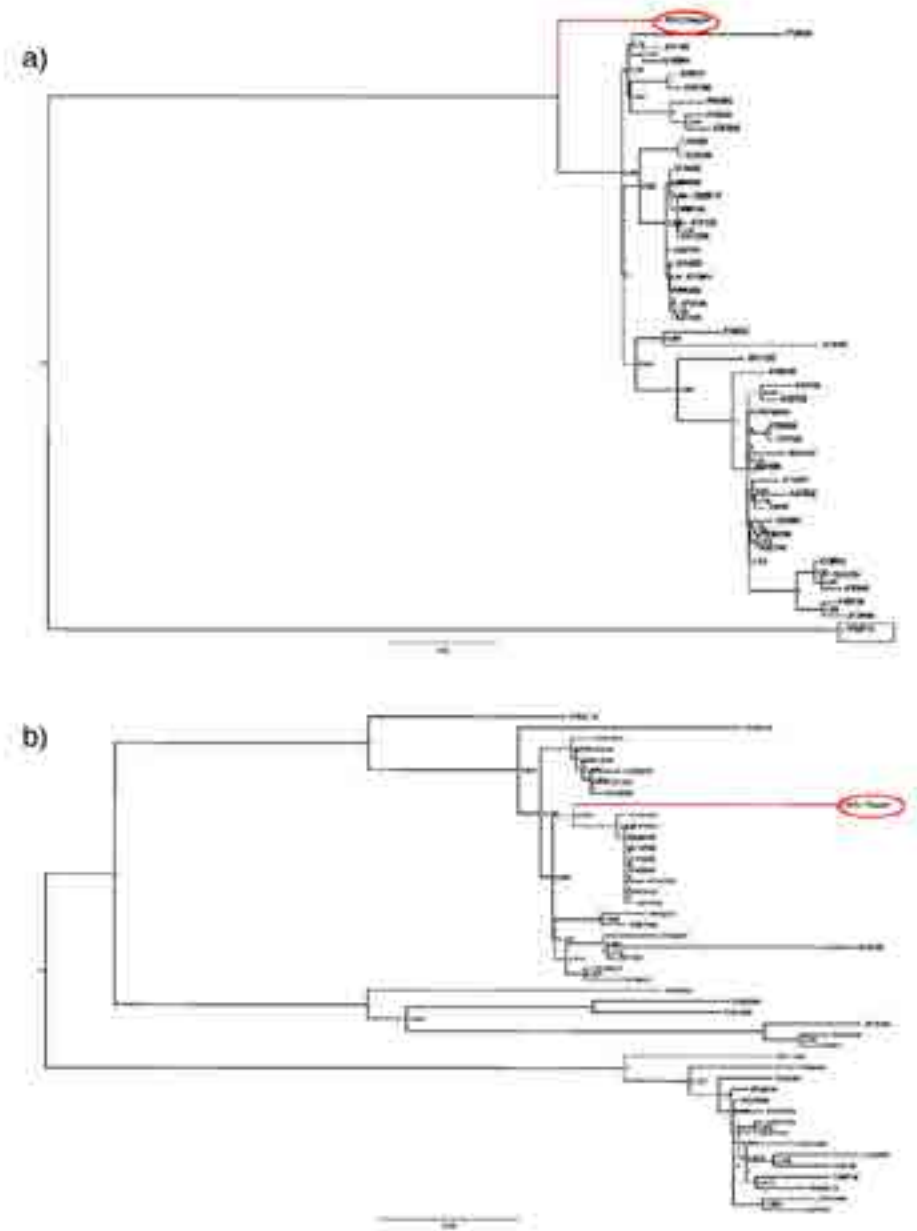
1. Carballada JM, Maroniche G, Lucero MS, Richetta M, Gómez E, Zoth SC and A Berinstein. (2015). Infectious Bursal Disease Virus non-structural protein VP5 is not a transmembrane protein. *Virology*. 483: 312–317.
2. Catelli E, Lupini C, Cecchinato M, Ricchizzi E, Brown P and CJ Naylor. (2010). Field avian Metapneumovirus evolution avoiding vaccine induced immunity. *Vaccine*. 28: 916-921.
3. Cui P, Ma SJ, Zhang YG, Li XS, Gao XY, Cui BA and HY Chen. (2013). Genomic sequence analysis of a new reassortant infectious bursal disease virus from commercial broiler flocks in central China. *Arch Virol*. 158: 1973–1978.
4. Deng X, Gao Y, Gao H, Qi X, Cheng Y, Wang X and X Wang. (2007). Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus. *Virus Res*. 129: 35–42.
5. Etteradossi N and YM Saif. (2013). Infectious Bursal Disease. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Venugopal N (Eds), *Disease of Poultry*, 13th edn. Ames, Iowa State Press, pp. 219-246.
6. Gao L, Li K, Qi X, Gao H, Gao Y, Qin L, Wang Y, Shen N, Kong X and X Wang. (2014). Triplet amino acids located at positions 145/146/147 of the RNA polymerase of very virulent infectious bursal disease virus contribute to viral virulence. *J Gen Virol*. 95 (Pt 4): 888-897.
7. He CQ, Ma LY, Wang D, Li GR and NZ Ding. (2009). Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology*. 384: 51–58.
8. Hernández M, Villegas P, Hernández D, Banda A, Maya L, Romero V, Tomás G and R Pérez. (2010). Sequence variability and evolution of the terminal overlapping VP5 gene of the infectious bursal disease virus. *Virus Genes*. 41 (1): 59-66.
9. Huson DH and D Bryant. (2010): User Manual for SplitsTree4 V4.11.3.
10. Jackwood DJ, Cookson KC, Sommer-Wagner SE, Le Galludec H, De Wit JJ. (2006) Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis*. Dec, 50 (4): 532-536.
11. Jackwood DJ. (2012). Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis*. 56: 574-577.

12. Kasanga CJ, Yamaguchi T, Munang'andu HM, Ohya K and H Fukushi. (2013). Genomic sequence of an infectious bursal disease virus isolate from Zambia: classical attenuated segment B reassortment in nature with existing very virulent segment A. *Arch Virol.* 158: 685–689.
13. Katoh K and DM Standley. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 30 (4): 772-780.
14. Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, Woelk CH and SD Frost. (2006). GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics.* 22 (24): 3096-3098.
15. Lazarus D, Pasmanik-Chor M, Gutter B, Gallili G, Barbakov M, Krispel S and Pitcovski J. (2008). Attenuation of very virulent infectious bursal disease virus and comparison of full sequences of virulent and attenuated strains. *Avian Pathol.* 37(2): 151-159.
16. Li Z, Wang Y, Xue Y, Li X, Cao H and SJ Zheng. (2012). Critical role for voltage-dependent anion channel 2 in Infectious Bursal Disease virus-induced apoptosis in host cells via interaction with VP5. *J Virol.* 86(3): 1328-1338.
17. Lombardo E, Maraver A, Castón JR, Rivera J, Fernández-Arias A, Serrano A, Carrascosa JL and Rodriguez JF. (1999). VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73(8):6973-83.
18. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M and E Catelli. (2016). A Molecular epidemiology study based on VP2 gene sequences reveals that a new genotype of infectious bursal disease virus is dominantly prevalent in Italy. *Avian Pathol.* Apr 25: 1-22.
19. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics.* 26 (19): 2462-2463.
20. Petkov D, Linnemann E, Kapczynski DR and HS Sellers. (2007). Full-length sequence analysis of four IBDV strains with different pathogenicities. *Virus Genes.* 34: 315–326.
21. Price MN, Dehal PS and AP Arkin. (2010). FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS one.* 5(3): e9490.
22. Rosenberger JK, Saif YM and DJ Jackwood. (2009). Bursite infettiva. In: Dufour-Zavala L., Swayne DE, Glisson JR, Pearson JE, Reed WM, Jackwood MW, Woolcock PR. *Manuale di laboratorio isolamento, identificazione e caratterizzazione dei patogeni aviari*, Quinta edizione, American Association of Avian Pathologists. 195-197.
23. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and S Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
24. Wang Y, Qi X, Kang Z, Yu F, Qin L, Gao H, Gao Y and X Wang. (2010). A single amino acid in the C-terminus of VP3 protein influences the replication of attenuated infectious bursal disease virus in vitro and in vivo. *Antivir Res.* 87: 223–229.

25. Wei Y, Li J, Zheng J, Xu H, Li L and L Yu. (2006). Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 350: 277–287.
26. Yu F, Ren X, Wang Y, Qi X, Song J, Gao Y, Qin L, Gao H and X Wang. (2013). A single amino acid V4I substitution in VP1 attenuates virulence of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) in SPF chickens and increases replication in CEF cells. *Virology.* 440(2): 204-209.



**Figura 1.** Network filogenetico basato sull’algoritmo NeighborNet comprendente 47 genomi completi di IBDV (concatenazione dei segmenti A e B). Il ceppo IBDV ITA è evidenziato in rosso.



**Figura 2.** Albero filogenetico ricostruito mediante maximum likelihood a partire dagli allineamenti del segmento A (a) e B (b). la robustezza di ciascuna clade, valutata tramite Shimodaira–Hasegawa [SH]-aLRT, è riportata in corrispondenza del rispettivo nodo. L'albero filogenetico del segmento A evidenzia che il ceppo ITA (cerchiato in rosso), rispetto ad altri genotipi, è più vicino a ceppi del sierotipo 2 (evidenziato dal rettangolo).