

# **PATOGENICITÀ DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA GENOTIPO ITA IN POLLI SPF**

Lupini C.<sup>1</sup>, Silveira F.<sup>1</sup>, Felice V.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>3</sup>, Meini A.<sup>3</sup>, Franzo G.<sup>2</sup>, Cecchinato M.<sup>2</sup>, Mescolini G.<sup>1</sup>, Listorti V.<sup>1</sup>, Catelli E.<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> *Ceva Salute Animale, Via Bartolomeo Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB) - Italia*

## **Summary**

Infectious bursal disease virus (IBDV) genotype ITA was detected in Italy in IBD-live vaccinated broilers in 2011. The aim of this study was to evaluate in experimental conditions the pathogenicity of ITA genotype in SPF chickens. Birds were inoculated at 35 days of life and observed up to 28 days post-infection (dpi). At specific time points 5 birds were euthanized, subjected to post-mortem examination and sampled. Histopathology of Bursa of Fabricius was performed and tissue distribution was evaluated by qRT-PCR. No clinical signs nor mortality were recorded. At necropsy Bursas of Fabricius showed enlargement and oedema in the acute phase (2nd dpi) of the infection, followed by persistent atrophy, which lasted until the end of the trial. Histology of the Bursa showed lymphocyte depletion, cystic cavities and poor regeneration process. IBDV RNA was persistently detected in bursal tissues until the end of the trial; ITA genotype was also frequently detected in other tissues collected such as thymus, cecal tonsil and spleen. This study showed that ITA genotype, though it has a subclinical course, causes a severe and persistent damage of Bursa tissues. Its circulation in broilers might be a threat for the poultry industry.

## **INTRODUZIONE**

La bursite infettiva è un'importante malattia del pollo causata da un avibirnavirus denominato Infectious Bursal Disease Virus (IBDV). I quadri clinici possono variare, a seconda della patogenicità del ceppo virale, da forme molto gravi con mortalità ed immunodepressione a forme subcliniche in cui l'aspetto saliente è esclusivamente la immunodepressione. 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 della borsa di Fabrizio. Nel 2011 sono stati isolati in Italia, da gruppi di broiler con scarse performances produttive, alcuni ceppi di IBDV con caratteristiche genetiche uniche, diverse da tutti gli altri ceppi presenti in *GenBank*. Il nuovo genotipo, denominato ITA, è piuttosto diffuso nel nostro paese (Lupini *et al.*, 2016). Il presente studio prevede la valutazione della patogenicità in polli SPF del genotipo ITA, dopo infezione sperimentale in condizioni d'isolamento biologico.

## **MATERIALI E METODI**

### *Piano sperimentale*

Sono stati utilizzati 65 polli SPF di 1 giorno di vita, alloggiati in isolatori per pollame

e numerati mediante anello al piede. Al 35° giorno di età, 40 animali (gruppo ITA) sono stati infettati per via orale con una dose di  $10^{4.5}$  EID<sub>50</sub> del ceppo 1829-01/12 (genotipo ITA); analogamente i restanti 25 soggetti (gruppo C-) sono stati inoculati con acqua sterile.

Gli animali sono stati quotidianamente osservati, dal primo al 15° giorno post-infezione, per valutazione della sintomatologia clinica. Prima dell'infezione sperimentale e successivamente ad intervalli settimanali, 10 soggetti per gruppo sono stati sottoposti a prelievi del sangue per esami sierologici, mediante ELISA per IBDV. Ai giorni 2, 4, 7, 14, 21 e 28 post-infezione (g.p.i.), cinque animali del gruppo ITA e tre del gruppo C- sono stati soppressi. Ciascun soggetto è stato pesato e sottoposto ad esame anatomopatologico e prelievo della borsa di Fabrizio per calcolo del

*Bursal index*. Dai soggetti soppressi, per la ricerca di IBDV tramite qRT-PCR, sono stati prelevati campioni di: borsa di Fabrizio, rene, fegato, milza, proventricolo, tonsille ciecali, timo, ghiandola di Harder e midollo osseo. Campioni di borsa di Fabrizio sono stati prelevati anche per esame istopatologico.

#### *Bursal index (BI)*

Tale indice è stato calcolato con la seguente formula: peso dell'organo/peso corporeo X1000, e fornisce un'indicazione del livello di compromissione dell'organo a seguito di infezione da IBDV.

#### *Istopatologia*

I tessuti sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. Quindi inclusi in paraffina, processati con metodi convenzionali, sezionati al microtomo e colorati con ematossilina ed eosina.

#### *Sierologia*

I sieri sono stati processati per rilevare la presenza di anticorpi per IBDV mediante kit ELISA del commercio (BioCheck (IBD) Infectious Bursal Disease Antibody Test Kit).

#### *Estrazione RNA virale e qRT-PCR*

L'estrazione dell'RNA virale da organi è stata effettuata secondo Li *et al.* (1993), e ha previsto l'utilizzo di Solution D contenente Guanidina Tiocianato. Per l'evidenziazione e la quantificazione di IBDV è stata utilizzata una qRT-PCR, messa a punto presso la Sezione di Microbiologia e Malattie infettive del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute dell'Università degli Studi di Padova. È stata utilizzata una curva standard creata correlando i valori di crossing point (Cp) di diluizioni di IBDV a titolo noto al Log della loro concentrazione iniziale. La quantificazione del campione è stata ottenuta per interpolazione del relativo valore di Cp sulla curva standard.

#### *Analisi statistica*

Per valutare le differenze fra gruppi sono stati applicati test statistici quali U di Mann Whitney o T di student. Le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $p$  value < 0,05.

## RISULTATI

In condizioni sperimentali gli animali del gruppo ITA non hanno mai mostrato mortalità o sintomatologia clinica. All'esame anatomopatologico, al 2° g.p.i., gli animali infettati mostravano una borsa di Fabrizio aumentata di volume, giallastra con presenza di edema gelatinoso sottosieroso (figura 1); erano inoltre presenti spruzzature emorragiche sulla superficie della coscia e della gamba (figura 2). Dal 4° g.p.i. fino al termine della prova (28° g.p.i.) era evidente atrofia della borsa di Fabrizio (figura 3), che presentava dimensioni visibilmente minori rispetto agli animali della stessa età, del gruppo controllo. I valori di *bursal index* (figura 4) confermano queste osservazioni, mostrando che dal 4° giorno post-infezione gli animali del gruppo ITA hanno valori medi di BI significativamente minori rispetto a quelli del gruppo di controllo ( $p < 0,005$ ). Le lesioni istopatologiche alla borsa di Fabrizio erano caratterizzate, progressivamente da edema, deplezione linfocitaria, formazioni cistiche e proliferazione del connettivo interfollicolare (figura 5).

La distribuzione e la quantificazione di IBDV nei tessuti esaminati, ottenute mediante qRT-PCR, sono riportate in tabella 1 ed in figura 6.

La borsa di Fabrizio è risultata sempre positiva fino al 28° g.p.i. con titoli virali anche di  $10^6$ /ml EID<sub>50</sub> (7° g.p.i.). Al termine della prova i titoli virali erano ancora di  $10^2$ /ml EID<sub>50</sub>.

Titoli superiori a  $10^4$ /ml EID<sub>50</sub> si sono rinvenuti, anche a livello di timo, tonsille cecali e milza.

L'andamento dei titoli anticorpali negli animali infetti è riportata in figura n. 7, tutti i soggetti infettati mostrano rialzo anticorpale a partire dal 7° g.p.i., con titoli crescenti fino al termine della prova.

## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

La mancanza di sintomatologia e mortalità osservata in polli SPF infettati sperimentalmente con IBDV genotipo ITA indica un andamento subclinico dell'infezione; l'atrofia della borsa di Fabrizio risulta essere precoce e prolungata fino al termine della prova. Anche se il genotipo ITA non è causa diretta di mortalità, il danno alla borsa di Fabrizio indotto, lascia presupporre una compromissione importante della risposta immunitaria. La patogenicità e la dinamica di distribuzione *in vivo* del genotipo ITA, definite in questo studio, sono più simili a quelle riportate per i ceppi *varianti* piuttosto che per i ceppi *classici subclinici*.

Il genotipo ITA mostra infatti una rapida e grave deplezione linfocitaria della borsa di Fabrizio ed un ritardato processo rigenerativo, caratteristiche queste tipiche dei ceppi *varianti* (Sharma et al., 1989; Palya et al., 2012).

L'importanza economica delle cosiddette *varianti* non è solo legata al loro potenziale immunosoppressivo ma anche alla frequente mancanza di cross-protezione nei loro confronti da parte dei vaccini IBDV convenzionali. Per questo motivo sarà importante verificare la protezione immunitaria conferita dai vaccini utilizzati nel nostro paese nei confronti di questo nuovo genotipo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Li J, Ling R, Randhawa JS, Shaw K, Davis PJ, Juhasz K, Pringle CR, Easton AJ and D Cavanagh D (1996). Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. *Virus Research*, 41: 185-191.

2. 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.* 25:1-22.
3. Palya V (2012). Determinants of Pathogenicity for Gumboro Virus and Epidemiology in Europe. *Gumboro Symposium: recent European experiences on IBD control*. Budapest (Hungary), 19<sup>th</sup>-20<sup>th</sup> of January 2012.
4. Sharma JM, Dohms JE and AL Metz. (1989). Comparative Pathogenesis of Serotype 1 and Variant Serotype 1 Isolates of Infectious Bursal Disease Virus and Their Effect on Humoral and Cellular Immune Competence of Specific-Pathogen-Free Chickens. *Avian Dis.* 33: 112-124.

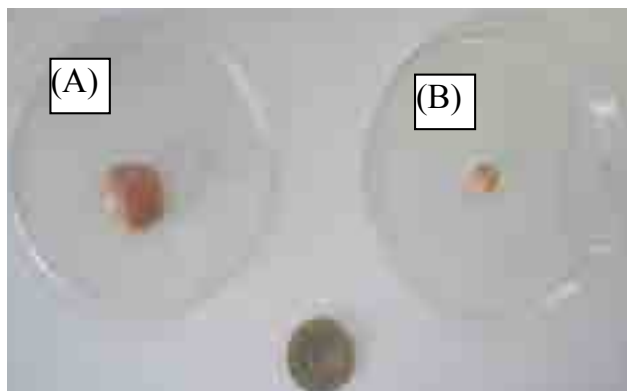
**Figura 1.** 2° giorno post-infezione. Gruppo ITA: Borsa di Fabrizio con edema sottosieroso.



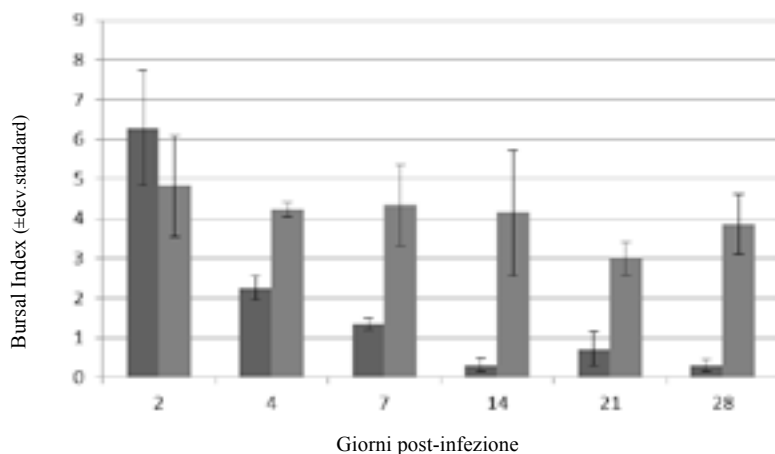
**Figura 2.** Gruppo ITA, 2° giorno post-infezione. Emorragie sottocutanee a livello degli arti inferiori.



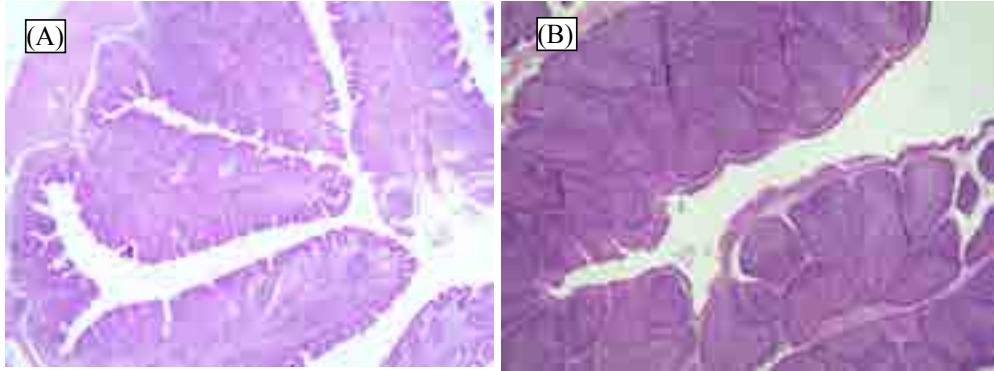
**Figura 3.** 28° giorno post infezione. (A) Gruppo C-: Borsa di Fabrizio di aspetto normale. (B) Gruppo ITA: Borsa di Fabrizio atrofica.



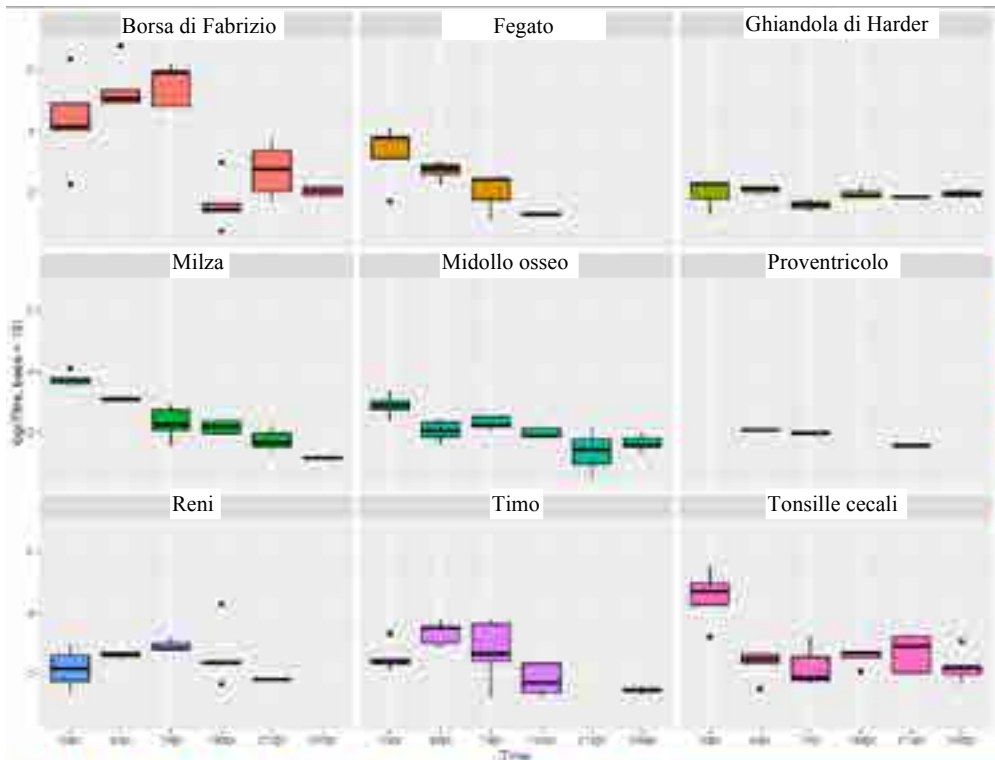
**Figura 4.** Media dei valori di Bursal Index nel gruppo ITA (grigio scuro) e nel gruppo C- (grigio chiaro). Dal 4°giorno post-infezione gli animali del gruppo ITA hanno valori medi significativamente minori rispetto a quelli del gruppo di controllo ( $p < 0,005$ ).



**Figura 5** Borsa di Fabrizio, 14° giorno post-infezione. (A) Gruppo ITA: atrofia delle pliche bursali, formazioni cistiche e proliferazione dello stroma interfollicolare fibroso. (B) Gruppo C-. follicoli di dimensioni e struttura normale per la età del soggetto esaminato (Ematossilin-eosina, 4X)



**Figura 6.** Box plot ottenuto dalla qRT-PCR per IBDV che mostra la concentrazione di RNA virale nei diversi tessuti.



**Tabella 1.** Evidenziazione di IBDV nei tessuti esaminati

g.p.i	Borsa	Timo	Rene	Fegato	Milza	Pro-ventricolo	Tonsille cecali	Ghiandola di Harder	Midollo osseo
2	5/5*	5/5	2/5	5/5	5/5	0/5	4/5	3/5	5/5
4	5/5	5/5	4/5	4/5	3/3	1/5	5/5	3/5	5/5
7	5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	1/5	2/5	2/5	5/5
14	5/5	5/5	5/5	1/5	4/5	0/5	4/5	3/5	5/5
21	5/5	0/5	1/5	0/5	3/5	1/5	5/5	1/5	2/5
28	4/5	2/5	0/5	0/5	1/5	0/5	5/5	3/5	4/5

\*numero di animali positivi/animali esaminati

**Figura 7.** Gruppo ITA: media dei titoli anticorpali ottenuti mediante Kit Elisa dopo infezione sperimentale.

