

## INDAGINE DI CAMPO SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS IMMUNOSOPPRESSIVI NEL POLLO DA CARNE

Lupini C., Mescolini G., Quaglia G., Silveira F., Felice V., Catelli E.

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

### Summary

Immunosuppressive viral diseases threaten the poultry industry by causing economic losses mainly as a result of birds' increased susceptibility to secondary infections and sub-optimal response to vaccinations. The major non-oncogenic immunosuppressive viruses of chickens are Infectious bursal disease virus (IBDV) and Chicken infectious anemia virus (CIAV).

In order to detect and molecularly characterize IBDV and CIAV circulating in a Northern Italian broiler farm, a longitudinal study was performed in two flocks of female birds for the duration of production cycle. Weekly, five birds/flock were humanely euthanized and Bursa of Fabricius were collected, pooled and subjected to PCR or RT-PCR. In both groups CIAV was detected consecutively from 3 to 6 weeks of age and sequencing of the strains showed that they grouped with genogroup III. An IBDV strain, belonging to the ITA genotype was detected at four weeks of age although the birds were vaccinated for IBDV at the hatchery.

### INTRODUZIONE

Le malattie virali immunosoppressive causano perdite economiche nell'industria avicola poiché determinano maggiore sensibilità degli animali alle infezioni secondarie e compromettono la risposta immunitaria alle vaccinazioni. Il virus della Bursite Infettiva (IBDV) e quello dell'Anemia Infettiva del pollo (CIAV) sono i principali virus immunosoppressivi, non-oncogeni che colpiscono il pollo (Balamurugan and Kataria, 2006).

IBDV è un virus a RNA della famiglia *Birnaviridae*. È l'agente eziologico della Bursite Infettiva, i cui 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. L'infezione da IBDV coinvolge principalmente i linfociti della linea B della borsa di Fabrizio determinando una soppressione anche di lunga durata della risposta anticorpale primaria (Etteradossi and Saif, 2008).

CIAV è un virus a DNA appartenente alla famiglia *Anelloviridae*, genere *Gyrovirus*. L'infezione provoca forma clinica quando avviene per via verticale, o orizzontale, nelle prime settimane di vita. Tuttavia, la maggior parte dei polli è protetta dall'infezione precoce grazie agli anticorpi vaccinali di origine materna. L'infezione dopo le 3 settimane di età si manifesta prevalentemente in maniera subclinica ma può causare una significativa immunosoppressione. Le cellule target del virus sono gli emocitoblasti nel midollo osseo e i precursori dei linfociti T (Balamurugan and Kataria, 2006).

Allo scopo di evidenziare e caratterizzare dal punto di vista molecolare ceppi di IBDV e CIAV circolanti nell'allevamento del broiler in Nord Italia, è stato svolto uno studio longitudinale in due gruppi di femmine, dalla nascita sino alla macellazione.

## **MATERIALI E METODI**

### *Gruppi oggetto dello studio e campionamento*

Sono stati oggetti dello studio due gruppi di broiler femmine, di circa 25.000 animali ciascuno, siti in un'area ad elevata densità avicola del Nord Italia. Gli animali erano stati oggetto di profilassi vaccinale in incubatoio nei confronti della Bursite Infettiva, della Malattia di Newcastle, della Malattia di Marek e della Bronchite Infettiva. A 5, 13, 18, 26, 35 e 40 giorni d'età, le Borse di Fabrizio di 5 polli per gruppo, selezionati random e soppressi, sono state raccolte e processate in pool per i successivi esami molecolari.

### *Estrazione dell'RNA e del DNA virale*

A partire da omogenati di borse in PBS, l'estrazione dell'RNA e del DNA virale è stata effettuata mediante kit del commercio QIAamp Viral RNA® (Qiagen) e QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen).

### *RT-PCR per IBDV*

IBDV è stato evidenziato mediante RT-PCR, 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.

### *PCR per CIAV*

Allo scopo di evidenziare la presenza di CIAV, il DNA estratto è stato amplificato secondo quanto riportato da Oluwayelu *et al.*, (2005) utilizzando i seguenti primer CUX-1 F 5'-CTG TTC CGA CAC ATT GAA ACC-3' e CUX-1 R 5'-CCC CAG TAC ATG GTG CTG TT-3'.

### *Analisi di sequenza*

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Milano, Italia), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Madrid, Spain).

Le sequenze nucleotidiche ottenute sono state elaborate, allineate e confrontate, mediante il *software* Bioedit, con sequenze omologhe presenti nel database *GenBank*. Gli alberi filogenetici sono stati quindi costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood del *software* Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). I valori di *bootstrap*, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

## **RISULTATI e DISCUSSIONE**

CIAV è stato riscontrato dalla 3<sup>a</sup> alla 6<sup>a</sup> settimana di vita in entrambe i gruppi oggetto di studio. L'analisi filogenetica ha permesso di classificare i ceppi CIAV rilevati come appartenente al genotipo III (figura 1).

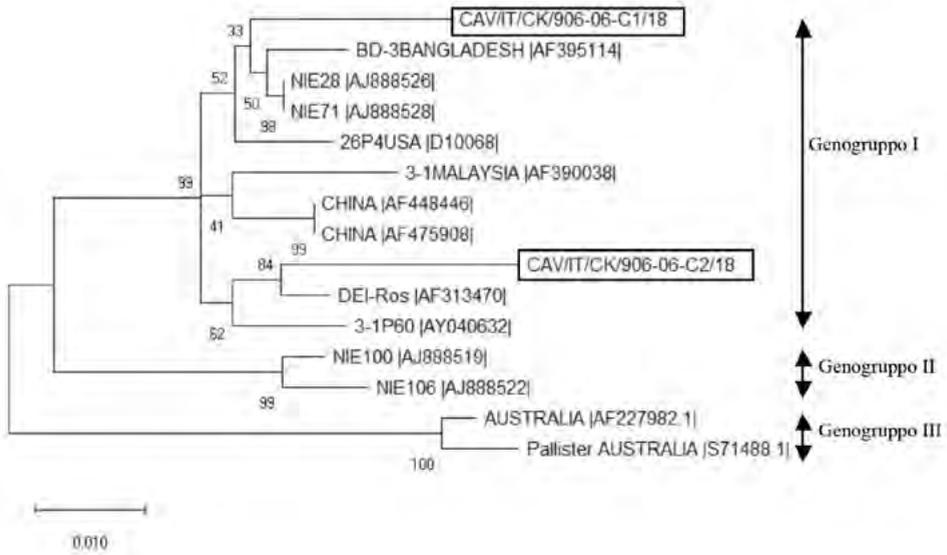
Un ceppo IBDV, appartenente al genotipo ITA (figura 2), è stato riscontrato a 4 settimane di vita nonostante i polli fossero vaccinati per IBDV in incubatoio. Tale genotipo circola nel nostro paese dal 2011 (Lupini *et al.*, 2016a), ha caratteristiche genetiche peculiari (Felice *et al.*, 2016) e mostra in condizioni sperimentali patogenicità simili a quelle riportate per i ceppi *varianti* di IBDV (Lupini *et al.*, 2016b).

## BIBLIOGRAFIA

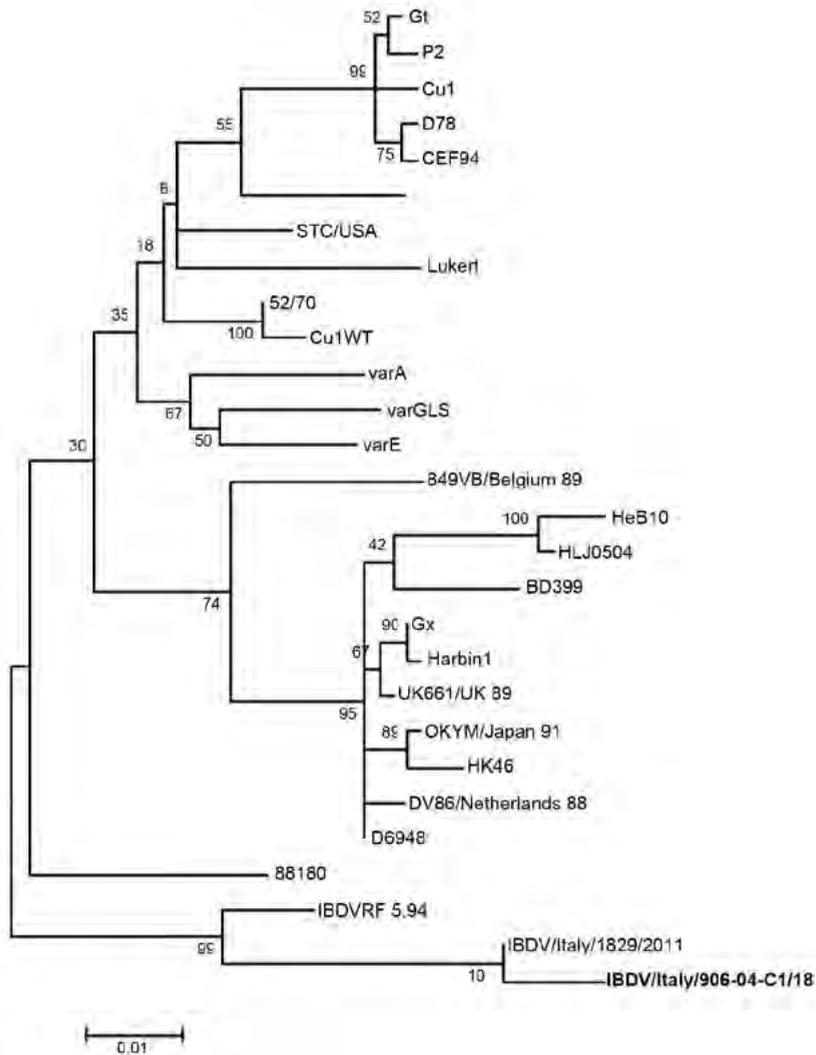
1. Balamurugan, V. and Kataria, J.M., 2006. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken—current status. *Veterinary Research Communications*, 30(5), 541–566
2. Etteradossi N., Saif Y. M. (2008). Infectious bursal disease. In: Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson S.R., McDougald L.R., Nolan L.R., Swayne D.E. (Eds). *Diseases of Poultry 12<sup>th</sup> Edition* pp. 185-208.
3. 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.
4. D.O. Oluwayelu, D. Todd, N.W. Ball, A.N.J. Scott, O.A. Oladele, B.O. Emikpe, O.A. Fagbohun, A.A. Owoade, and O.D. Olaleye (2005) Isolation and Preliminary Characterization of Chicken Anemia Virus from Chickens in Nigeria. *Avian Diseases*, 49(3):446-450.
5. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and S Kumar. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology Evolution* 30: 2725-2729.

**Tabella 1.** Risultati dell'analisi molecolare per la ricerca di CIAV e IBDV nei gruppi campionati

Giorni di vita	CIAV		IBDV	
	Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 1	Gruppo 2
5	-	-	-	-
13	-	-	-	-
18	+	+	-	-
26	+	+	+	+
35	+	+	-	-
40	+	+	-	-



**Figura 1.** Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche di ceppi selezionati CIAV evidenziati in questo studio (denominati CAV/IT/CK/906-06-C1/18 e CAV/IT/CK/906-06-C2/18) e dei ceppi presenti sul database *Genbank*.



**Figura 2.** Albero filogenetico ottenuto dalla sequenza nucleotidica di IBDV evidenziato in questo studio (denominato IBDV/Italy/906-04-C1/18) e di ceppi di riferimento presenti sul database *Genbank*.