

## CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI RIASSORTANTI DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA (IBDV) CIRCOLANTI IN ITALIA

Legnardi M.<sup>1</sup>, Tonellato F. R.<sup>2</sup>, Cioffi A.<sup>2</sup>, Tucciarone C.M.<sup>1</sup>, Franzo G.<sup>1</sup>, Garavini G.<sup>3</sup>, Trevisani G.<sup>3</sup>, Dall'Angelo A.<sup>3</sup>, Cecchinato M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)*

<sup>2</sup> *CEVA Salute Animale Italia, Viale Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza (MB)*

<sup>3</sup> *Veterinario aziendale*

### Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is an immunosuppressive pathogen bearing a considerable impact on the global poultry industry. Despite the amount of literature on IBDV, its traditional classification system, which recognizes classical, variant and very virulent strains, is being questioned for lacking standardization and for not capturing the increasing heterogeneity of the virus. Recently, two phylogeny-based classification methods have been proposed to solve these issues. One is based on the VP2 sequence, and the other on both VP1 and VP2, thus allowing to detect reassortant strains.

This work reports the detection, during routine monitoring activities conducted in Italy, of a cluster of field strains in both broiler and layer farms adopting a range of different vaccination protocols. According to the two classifications, the strains are featured by a very virulent-like VP2. Their VP1, on the other hand, has classical-like features. Based on both genome segments, they group with strains detected within the last decade primarily in Russia and the Middle East, and may be classified as reassortants.

Despite the sampling not being fully representative, it seems that reassortant strains may be extensively circulating on Italian soil. Their actual impact is still unknown, although their features might suggest a reduced pathogenicity compared to proper very virulent strains. These results highlight the importance of a steady and attentive IBDV monitoring by considering both genome segments, and may encourage further works to better characterize the detected strains and the protection conferred against them by commonly adopted vaccination protocols.

### INTRODUZIONE

Il virus della bursite infettiva (IBDV) è senza dubbio uno dei patogeni aviari più impattanti a livello sanitario ed economico su scala globale. IBDV appartiene al genere *Avibirnavirus* della famiglia *Birnaviridae*, ed è caratterizzato da un genoma a doppio filamento di RNA composto da due segmenti, denominati A e B. Ne sono riconosciuti due sierotipi, chiamati 1 e 2, ma solo il primo è patogeno. IBDV causa una sintomatologia immunosoppressiva, diretta conseguenza del suo tropismo per i linfociti B immaturi localizzati principalmente nella borsa di Fabrizio (Alkie & Rautenschlein, 2016). Nei polli, l'unico ospite suscettibile alla malattia, il periodo di massima suscettibilità va dalle 2 alle 6 settimane, in cui la borsa di Fabrizio è al suo massimo stadio di sviluppo (Ingrao et al., 2013). La manifestazione clinica include sintomi aspecifici come depressione, disidratazione, anoressia e diarrea, con una mortalità estremamente variabile in base al ceppo coinvolto (Mahgoub, 2012). Le lesioni più frequenti comprendono emorragie a livello di muscoli della coscia e pettorali, un aumento

del contenuto mucoso intestinale ed emorragie della mucosa della borsa di Fabrizio, la quale dapprima aumenta di volume per poi andare incontro ad atrofia. L'immunosoppressione predispone inoltre a infezioni secondarie e può compromettere l'efficacia della vaccinazione nei confronti di altri patogeni (Etteradossi & Saif, 2021).

Nonostante il grande interesse da parte della comunità scientifica, che fa di IBDV il quarto patogeno maggiormente studiato in ambito avicolo (Bertran et al., 2020), la classificazione di questo virus risente tuttora di una mancanza di standardizzazione e sistematicità. La tradizionale categorizzazione in ceppi classici, varianti e *very virulent*, è basata infatti su differenze sia in termini di virulenza che di antigenicità, richiedendo l'esecuzione di diversi test, a loro volta scarsamente standardizzati, per un'adeguata caratterizzazione (Jackwood et al., 2018). Un ulteriore punto a sfavore è la difficoltà nel caratterizzare adeguatamente una vasta gamma di ceppi atipici e dalla diffusione geografica spesso circoscritta, il cui ritrovamento è sempre più frequente. La diffusione delle metodiche molecolari, che ormai rappresentano i test più utilizzati a livello diagnostico, offre al contempo nuove opportunità e nuove sfide. Se è vero che esse non permettono una valutazione diretta né della patogenicità né dell'antigenicità, le potenzialità in termini di standardizzazione fanno di esse la piattaforma ideale per una classificazione robusta, informativa e dalla facile condivisione.

Un primo tentativo in tal senso è rappresentato dalla classificazione filogenetica recentemente proposta da Michel & Jackwood (2017), basata su una porzione ipervariabile del gene della proteina virale 2 (hvVP2), di gran lunga la porzione meglio caratterizzata del genoma di IBDV per via della sua centralità nella determinazione della patogenicità (Brandt et al., 2001). Questa classificazione individua sette diversi genogruppi all'interno del sierotipo 1. I genogruppi G1, G2 e G3, includono rispettivamente i ceppi classici, varianti e *very virulent*, mentre quelli da G4 a G7 raggruppano altrettante varianti atipiche, offrendo quindi una caratterizzazione più precisa dell'eterogeneità di IBDV. Il principale difetto di questa classificazione è che, basandosi solo sulla VP2, sita nel segmento A del genoma, essa non permette di individuare i fenomeni di riassortimento tra diversi segmenti, che gioca un ruolo importante nell'evoluzione genetica di IBDV (Jackwood, 2012; Wu et al., 2020). Una seconda classificazione, proposta da Islam et al. (2021), risolve questo problema prendendo in considerazione non solo la VP2, ma anche la VP1, localizzata sul segmento B del genoma. Vengono così individuati nove genogruppi basati sulla VP2 (A1-A9, largamente corrispondenti con quelli individuati dalla precedente classificazione) e cinque basati sulla VP1. I genotipi così individuati sono finora quindici, corrispondenti ad altrettante combinazioni tra i due segmenti (A1B1, A1B2, ecc.).

Questo lavoro riporta l'identificazione, durante le attività diagnostiche routinarie, di ceppi di campo sinora non riportati in Italia. A seguito del loro ritrovamento, ulteriori indagini sono state svolte per una più precisa caratterizzazione a livello molecolare.

## **MATERIALI E METODI**

### *Campionamento*

L'indagine è stata svolta su campioni prelevati in allevamenti italiani tra febbraio e agosto 2021 per finalità di monitoraggio, e analizzati all'interno dell'attività diagnostica del laboratorio di Biotecnologie e Malattie Infettive del dipartimento MAPS dell'Università degli Studi di Padova. Gli allevamenti appartenevano a diverse ditte e categorie produttive (ovaiole e *broiler*). I gruppi considerati differivano inoltre in

termini di protocollo vaccinale applicato e di età al campionamento. I campioni sono stati prelevati individualmente, selezionando dieci animali per gruppo, o in *pool*, e consistevano in borse di Fabrizio oppure in tamponi cloacali.

#### *Analisi molecolare*

Dopo l'eluizione dei campioni in PBS, gli acidi nucleici sono stati estratti con il kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, Basilea, Svizzera). Gli estratti sono stati quindi sottoposti a RT-PCR *one-step* con il kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), utilizzando i *primer* 743-1 (5'-GCCCAGAGTCTACACCAT-3') e 743-2 (5'-CCCGGATTATGTCTTTGA-3') disegnati da Jackwood & Sommer-Wagner (2005) per amplificare una porzione della VP2. I campioni positivi sono stati sottoposti a sequenziamento Sanger e la classificazione preliminare è avvenuta tramite comparazione delle sequenze ottenute ad un database di ceppi di referenza.

Ai fini di una più precisa caratterizzazione, una porzione di VP1 dei ceppi di campo ritrovati è stata amplificata utilizzando i *primer* B-Univ-F (5'-AATGAGGAGTATGAGACCGA-3') e B-Univ-R (5'-CCTTCTCTAGGTCAATTGAGTACC-3') pubblicati da Islam et al. (2012).

#### *Classificazione filogenetica*

La classificazione dei ceppi di campo secondo Michel & Jackwood (2017) ha previsto la preparazione di un dataset composto dai ceppi di referenza individuati nell'articolo originale e da Jackwood et al. (2018), rispettivamente per i livelli di genogruppo e di *lineage*. Per la classificazione secondo Islam et al. (2021) sono stati invece preparati due differenti dataset, uno per VP2 e l'altro per VP1, includendo un numero limitato di sequenze a rappresentanza di ciascun genogruppo sulla base delle indicazioni dell'articolo originale.

Dopo aver incluso le sequenze italiane, i rispettivi dataset sono stati allineati con il metodo MUSCLE (Edgar, 2004). Gli alberi filogenetici sono stati quindi ottenuti con il metodo di *Maximum Likelihood* (metodo di sostituzione Tamura-Nei, 1000 *bootstrap*). L'intero processo ha visto l'impiego del software MEGA X (Kumar et al., 2018).

## **RISULTATI**

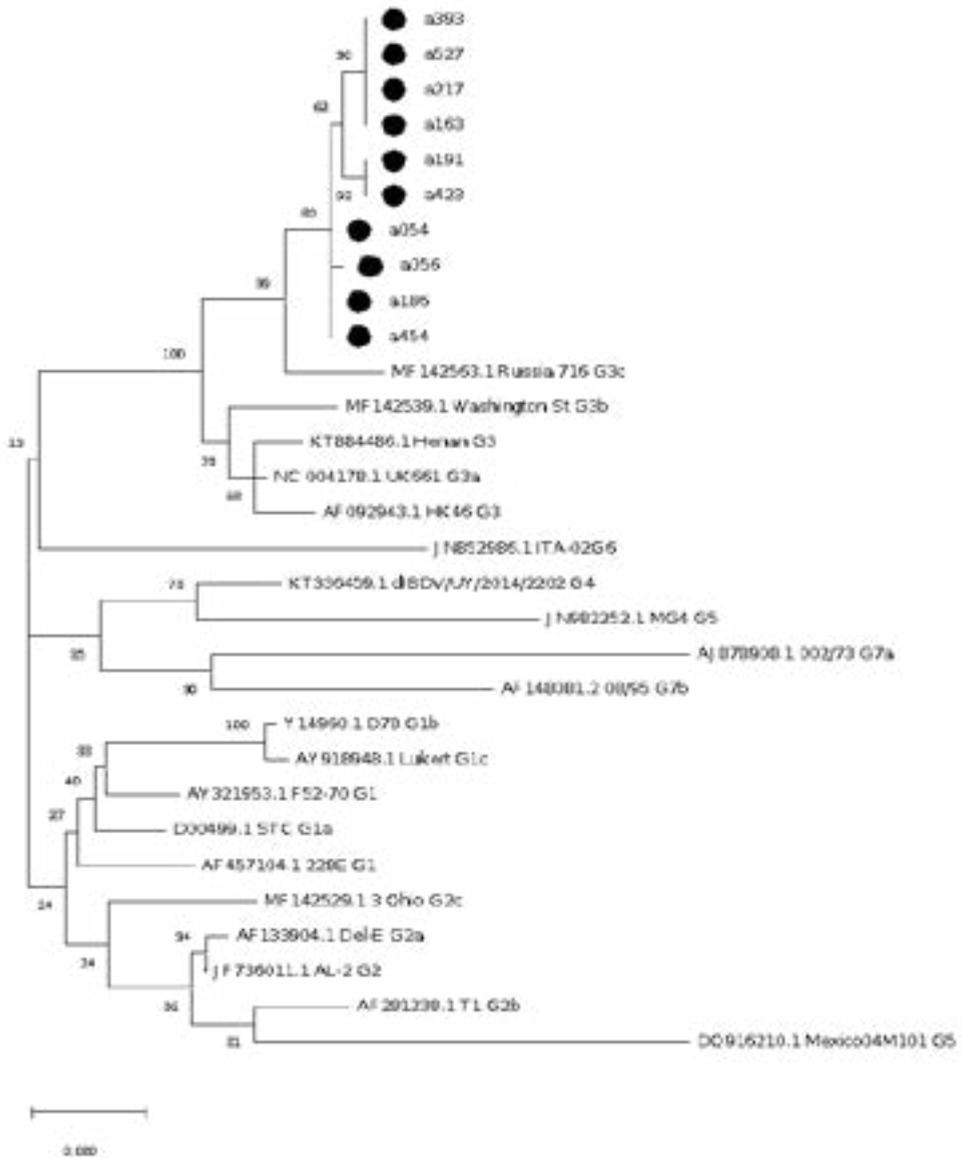
#### *Campionamento e risultati delle analisi molecolari*

Lo studio ha coinvolto un totale di 29 gruppi. Per quindici volte le indagini molecolari hanno evidenziato la presenza di ceppi vaccinali, sempre coincidenti con il vaccino effettivamente somministrato. Altri quattro gruppi sono risultati totalmente negativi. Infine, dieci diversi ceppi sono stati identificati preliminarmente come *very virulent*, e ulteriori analisi sono state quindi condotte a livello di VP1. In nessun gruppo è stata attestata la contemporanea presenza di più di un ceppo.

#### *Classificazione filogenetica*

La classificazione secondo Michel & Jackwood (2018), basata su un dataset che includeva 30 sequenze, ha evidenziato l'appartenenza dei ceppi di campo presi in esame al genogruppo G3, che raggruppa i ceppi *very virulent* (Figura 1). Sulla base delle 480 posizioni nucleotidiche considerate a livello di hvVP2, i ceppi italiani sono caratterizzati da un'identità media del 99,4%.

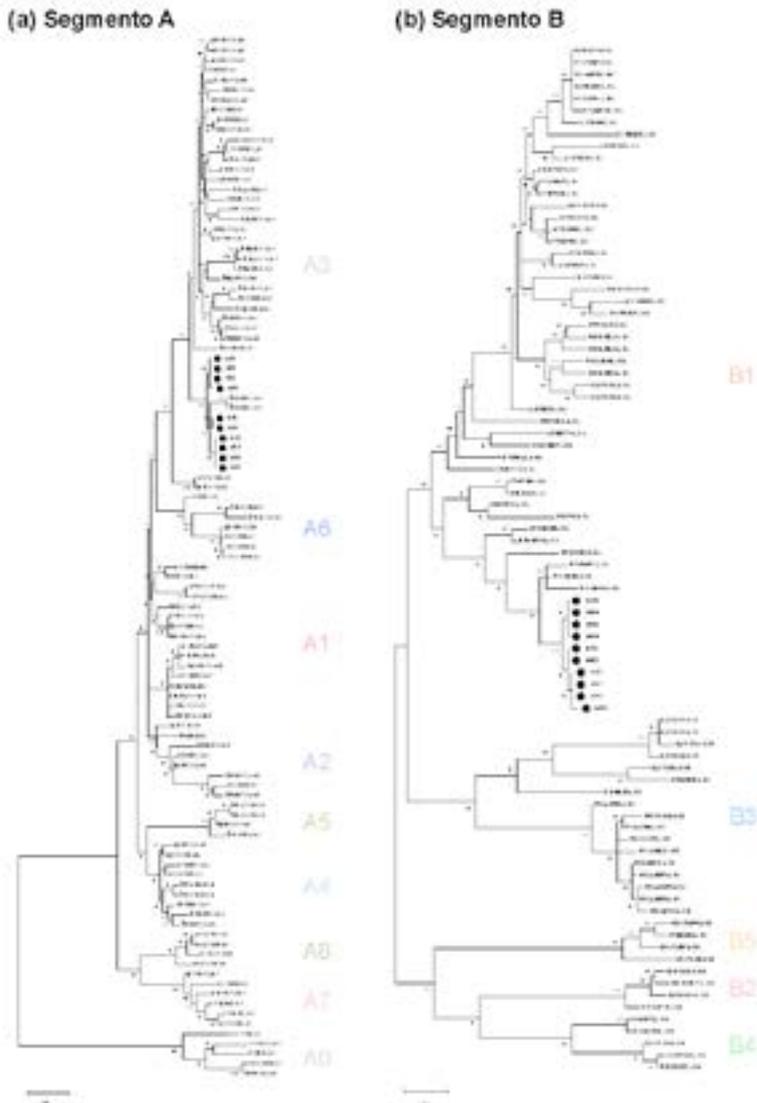
**Figura 1.** Albero filogenetico che riporta la classificazione secondo Michel & Jackwood (2017) basata sulla sequenza della hvVP2. Le sequenze dei ceppi di campo italiani sono evidenziate con il simbolo ●.



Per quanto riguarda la classificazione secondo Islam et al. (2021), il database VP2 comprendeva 105 sequenze e 338 posizioni nucleotidiche site nella hvVP2, mentre quello VP1 considerava 92 sequenze e 444 posizioni, di fatto corrispondenti alla regione *marker* B individuata da Alfonso-Morales et al. (2015). Questa seconda classifica-

zione ha prodotto esiti analoghi a livello di VP2 (Figura 2a), secondo cui le sequenze in esame ricadono nel genotipo A3 (*very virulent*). È stata inoltre evidenziata la presenza di ulteriori ceppi *very virulent* all'interno del *cluster* di sequenze italiane. Basandosi sulla VP1, i ceppi italiani ricadono invece nel genogruppo B1 (*classical-like*) (Figura 2b). Prendendo in considerazione entrambi i segmenti, i ceppi sono quindi classificati nel genotipo A3B1.

**Figura 2.** Alberi filogenetici costruiti secondo la classificazione proposta da Islam et al. (2021) a livello di VP2 (a) e VP1 (b). Le sequenze dei ceppi italiani sono evidenziate con il simbolo ●.



## DISCUSSIONE

Le analisi molecolari hanno permesso di evidenziare la presenza sia di ceppi vaccinali che di campo. L'identificazione del ceppo vaccinale somministrato è di per sé auspicabile, in quanto il meccanismo di azione dei vaccini ad immunocomplessi e dei vivi attenuati è basato sulla colonizzazione della borsa di Fabrizio da parte dei ceppi di IBDV su cui sono basati e sulla loro attiva replicazione nell'organo. Il funzionamento dei vaccini ricombinanti non dipende invece dalla colonizzazione della borsa di Fabrizio, ma, essendo questi vaccini basati su herpesvirus ingegnerizzati (r-HVT) per esprimere sulla loro superficie la VP2 di IBDV, che può quindi essere identificata tramite RT-PCR in diversi tessuti, occasionalmente anche a livello di borsa (Ingrao et al.2017).

D'altro canto, la circolazione di ceppi di campo può rappresentare una minaccia dal punto di vista epidemiologico. In base alle due classificazioni filogenetiche prese in considerazione, non c'è dubbio che i ceppi identificati si caratterizzino come *very virulent* sulla base della sequenza della VP2. Di più difficile interpretazione è la classificazione a livello di VP1, che li fa ricadere all'interno del genogruppo B1. Questo genogruppo include una gran varietà di ceppi, che a livello di VP2 sono categorizzati come A1 (classici), A2 (varianti), A3 (*very virulent*), A4 (*distinct* IBDV), A6 (ITA) e persino A0 (Sierotipo 2).

I ceppi di campo ritrovati potrebbero non rappresentare una novità nel panorama epidemiologico italiano. Recenti studi epidemiologici hanno riportato la circolazione di ceppi con caratteristiche compatibili con gli stipiti qui descritti, per quanto l'assenza di sequenze disponibili pubblicamente prevenga un confronto diretto (Lupini et al., 2016; Gambi et al., 2020). Tuttavia, essendo questi lavori basati sul sequenziamento della sola VP2, i ceppi venivano classificati come *very virulent*. Prendendo in considerazione entrambi i segmenti del genoma, si scopre invece che le sequenze con la maggior percentuale di identità ritrovabili in database pubblici sono state identificate tra il 2014 e il 2016 principalmente in Russia e Medio Oriente (Jackwood et al., 2018) (Tabella 1).

Le uniche informazioni disponibili sui ceppi russi e mediorientali sono relative alla loro caratterizzazione molecolare (Michel & Jackwood, 2017). A livello di VP2, essi hanno caratteristiche tipiche dei ceppi *very virulent*. Per quanto riguarda la VP1 invece, è stato evidenziato come essi formino un *cluster* ben delimitato all'interno del genogruppo G1 (Islam et al., 2021). Analogamente, i ceppi italiani possono essere classificati come riassortanti. Ciononostante, la differenza sostanziale con altri ceppi riassortanti recentemente identificati in Europa settentrionale e occidentale (Mató et al., 2020), è che per questi ultimi l'origine della VP1 è facilmente riconducibile a ceppi classici attenuati, mentre lo stesso non sembra valere per gli stipiti italiani. Una possibile spiegazione può essere trovata nel tempo trascorso dall'evento di riassortimento, che attraverso una successiva evoluzione può aver portato all'acquisizione di caratteristiche peculiari all'interno del genogruppo G1.

**Tabella 1.** Sequenze caratterizzate dalla maggiore affinità (identità maggiore o uguale di 97,5%) con i ceppi di campo italiani a livello di VP1 e VP2, identificati attraverso l’algoritmo BLAST. Il ceppo utilizzato per l’analisi è stato a054, considerando un segmento di 480 posizioni nucleotidiche per la VP2 e 444 per la VP1.

VP1			VP2		
ID ceppo	Numero d’accesso GenBank	Percentuale d’identità	ID ceppo	Numero d’accesso GenBank	Percentuale di identità
224_Russia	MF142464	98,65%	710_Jordan	MF142560	98,12%
189_Russia	MF142463	98,65%	276_Jordan	MF142517	98,12%
716_Russia	MF142488	98,62%	774_Kazakistan	MF142578	97,92%
717_Russia	MF142489	98,59%	590_Russia	MF142549	97,71%
774_Kazakistan	MF142497	97,52%	437_Russia	MF142537	97,71%
			232_Russia	MF142515	97,71%
			189_Russia	MF142509	97,71%
			716_Russia	MF142563	97,50%

Pur non basandosi su un campionamento realmente rappresentativo, i risultati ottenuti suggeriscono che i ceppi di campo ritrovati stiano circolando diffusamente sul territorio italiano. Il loro reale impatto epidemiologico sembra essere limitato, in quanto in nessuno degli allevamenti campionati è stata riscontrata una sintomatologia conclamata. Ciò potrebbe essere dovuto ad una limitata patogenicità di questi ceppi, compatibile con la loro natura di riassortanti, o ad una buona efficacia dei protocolli vaccinali adottati. A tal proposito, è necessario sottolineare che i ceppi di campo sono stati identificati almeno una volta in gruppi vaccinati con tutte le tipologie di vaccino considerate. Il loro rinvenimento non sembra quindi essere associato alla scarsa efficacia di un particolare vaccino.

Un altro dato interessante è l’assenza di co-circolazioni, in particolare tra ceppi vaccinali e di campo, all’interno dello stesso gruppo. Seppur possibili, esse sembrano avvenire raramente, al contrario di ciò che succede per altri virus aviari. Questa informazione può risultare utile per una corretta pianificazione delle attività diagnostiche, e per una corretta interpretazione delle stesse.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno permesso di evidenziare la presenza di ceppi riassortanti sul territorio italiano. Il fatto che, limitandosi a considerare la sequenza della VP2, essi vengano classificati come *very virulent*, evidenzia l’importanza di considerare entrambi i segmenti del genoma di IBDV per una classificazione davvero esaustiva. L’impatto sanitario di questi ceppi sembra essere limitato ma, anche alla luce della loro circolazione in diverse filiere e tipologie produttive, ulteriori studi sono necessari per una precisa valutazione della loro patogenicità e della protezione offerta contro di essi da parte dei vari protocolli vaccinali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alfonso-Morales A, Rios L, Martinez-Perez O, Dolz R, Valle R, Perera CL, Bertran K, Frías MT, Ganges L, Díaz de Arce H, Majó N, Núñez JI and LJ Pérez. (2015). Evaluation of a phylogenetic marker based on genomic segment B of infectious bursal disease virus: facilitating a feasible incorporation of this segment to the molecular epidemiology studies for this viral agent. *PLoS One*, 10: e0125853.
2. Alkie TN and S Rautenschlein. (2016). Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Veterinary Medicine (Auckland, N.Z.)*, 19: 9-18.
3. Bertran K, Cortey M and I Díaz. (2020). The use of H-index to assess research priorities in poultry diseases. *Poultry science*, 99(12): 6503-6512.
4. Block H, Meyer-Block K, Rebeski DE, Scharr H, de Wit S, Rohn K and S Rautenschlein. (2007). A field study on the significance of vaccination against infectious bursal disease virus (IBDV) at the optimal time point in broiler flocks with maternally derived IBDV antibodies. *Avian Pathology*, 36(5): 401-409.
5. Brandt M, Yao K, Liu M, Heckert RA and VN Vakharia. (2001). Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 75: 11974-11982.
6. De Herdt P, Ducatelle R, Uyttebroek E, Sneep A and R Torbeyns. (2000). Significance of Infectious Bursal Disease Serology in an Integrated Quality Control Program under European Epidemiologic Conditions. *Avian Diseases*, 44(3): 611-617.
7. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. (2004). *Nucleic Acids Research*, 32: 1792-1797.
8. Etteradossi N and YM Saif. (2020). Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, Wiley-Blackwell, pp. 257-283.
9. Gambi L, Berto G, Fiorentini L, Koutoulis K, Barbieri I, Massi P and G Tosi. (2020). Studio della circolazione del virus della bursite infettiva negli allevamenti di pollastre della linea ovaiola da consumo nel periodo maggio-settembre 2019. In: *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2020. LIX Convegno Annuale & V Simposio Scientifico*. P. 119
10. Ingrao F, Rauw F, Lambrecht B and T van den Berg. (2013). Infectious bursal disease: a complex host-pathogen interaction. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(3): 429-438.
11. Ingrao F, Rauw F, van den Berg T and B Lambrecht. (2017). Characterization of two recombinant HVT-IBD vaccines by VP2 insert detection and cell-mediated immunity after vaccination of specific pathogen-free chickens. *Avian Pathology*, 46(3): 289-299.
12. Islam MR, Nooruzzaman M, Rahman T, Mumu TT, Rahman MM, Chowdhury EH, Etteradossi N and H Müller. (2021). A unified genotypic classification of infectious bursal disease virus based on both genome segments. *Avian Pathology*, 50: 190-206.
13. Jackwood DJ (2012). Molecular Epidemiologic Evidence of Homologous Recombination in Infectious Bursal Disease Viruses. *Avian Diseases*, 56(3): 574-577.
14. Jackwood DJ and SE Sommer-Wagner. (2005). Molecular Epidemiology of In-

- fectious Bursal Disease Viruses: Distribution and Genetic Analysis of Newly Emerging Viruses in the United States. *Avian Diseases*, 49: 220-226.
15. Jackwood DJ, Schat KA, Michel LO and S de Wit. (2018). A proposed nomenclature for infectious bursal disease virus isolates. *Avian Pathology*, 47: 576-584.
  16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and K Tamura. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549.
  17. Lupini C, Giovanardi D, Pesente P, Bonci M, Felice V, Rossi G, Morandini E, Cecchinato M and Catelli E. (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 Pathology*, 45(4): 458-464.
  18. Mahgoub HA. (2012). An overview of infectious bursal disease. *Arch Virol*, 157: 2047-2057.
  19. Mató T, Tatár-Kis T, Felföldi B, Jansson DS, Homonnay Z, Bányai K and V Palya. (2020). Occurrence and spread of a reassortant very virulent genotype of infectious bursal disease virus with altered VP2 amino acid profile and pathogenicity in some European countries. *Veterinary Microbiology*, 245: 108663.
  20. Michel LO and DJ Jackwood. (2017). Classification of infectious bursal disease virus into genogroups. *Archives of Virology*, 162: 3661-3670.
  21. Wu T, Wang Y, Li H, Fan L, Jiang N, Gao L, Li K, Gao Y, Liu C, Cui H, Pan Q, Zhang Y, Wang X and X Qi. (2020). Naturally occurring homologous recombination between novel variant infectious bursal disease virus and intermediate vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 245:108700.