

CARATTERIZZAZIONE GENOMICA DI CEPPI DEL VIRUS DELLA MALATTIA DI GUMBORO ISOLATI IN ITALIA NEL PERIODO 2006-2009

Moreno A.¹, Barbieri I.¹, Ceruti R.², Morandini E.³, Cordioli P.¹

- 1- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia
- 2- Gesco consorzio cooperativo, Cazzago San Martino, Bs
- 3- Veronesi Verona Spa., Verona

Introduzione

La bursite infettiva (IBD) rappresenta da tempo, ed in particolare negli ultimi decenni, un importante problema, non solo economico, dell'allevamento avicolo intensivo. Fino alla fine degli anni '80, infatti, la malattia veniva controllata abbastanza facilmente mediante misure di profilassi indiretta (vaccinazione). Tuttavia, successivamente, si sono registrati, in varie parti del mondo dove l'avicoltura intensiva è più sviluppata, numerosi casi di "rottture vaccinali" causate dall'insorgenza di "nuove varianti" virali. Negli USA è stato dimostrato che in queste "nuove varianti" (US variants) si era realizzato un *drift* antigenico con conseguente mancata risposta anticorpale crociata tale da rendere i vaccini classici non sufficientemente protettivi (7, 10). Inoltre, la comparsa di quadri di IBD acuta caratterizzati da mortalità elevate, sono stati riportati in Europa ed attribuiti a ceppi dotati di elevata patogenicità, i c.d. "very virulent", anche in assenza di *drifts* antigenici significativi (4). In Italia, casi di IBDV sono stati riportati alla fine degli anni novanta, soprattutto in Emilia Romagna dove la malattia poteva essere considerata endemica. A partire del 2002, si è registrato un notevole aumento di casi anche in altre regioni italiane.

Il virus IBDV appartenente alla famiglia Birnaviridae, è un virus a RNA privo di envelope, con genoma a RNA a doppia elica bisegmentato. Sono riconosciuti due sierotipi. Il sierotipo 1 è il ceppo patogeno del pollo, di cui si conoscono diversi ceppi o varianti: il ceppo classico (prototipo F52/70), varianti, very virulent (divise in tipiche e atipiche) e vaccinali (*mild*, *mild intermediate*, *intermediate*, *intermediate plus*). Il sierotipo 2, isolato inizialmente nel tacchino ma diffuso anche nel pollo, è apatogeno. Strutturalmente sono note 5 proteine: VP1 che codifica per la RNA polimerasi; VP2 che induce Ac neutralizzanti e presenta gli Ag specifici di sierotipo; VP3 che presenta gli Ag specifici di gruppo; VP4 che codifica per la proteasi virale; VP5 che ha funzioni regolatorie. In particolare nella VP2 c'è una piccola regione, denominata ipervariabile, di soli 144 amminocidi (aa) estremamente idrofoba, con due picchi idrofili agli estremi localizzati in posizione 210-225 e 312-324 rispettivamente (picchi maggiori A e B) che corrispondono agli epitopi neutralizzanti (1, 2). Inoltre è stata riportata anche la presenza di altre due picchi idrofili minori 1 e 2 (posizioni 248-252 e 279-290) altrettanto importanti dal punto di vista antigenico (13) poiché è proprio in queste regioni che più spesso insorgono mutazioni, spesso puntiformi, che determinano la comparsa di nuovi sierotipi o varianti patogene.

Studi di caratterizzazione antigenica e genomica condotti precedentemente su ceppi isolati dal 1996 al 2005 (9, 11) hanno rilevato che la maggior parte dei ceppi IBDV circolanti nel territorio italiano appartenevano al tipo vvIBDV. Tuttavia era stato osservato che alcuni ceppi vvIBDV, provenienti principalmente dall'Emilia Romagna,

presentavano caratteristiche sia antigeniche che genomiche diverse dai ceppi vvIBDV tipici. Lo scopo di questo lavoro è stato pertanto l'approfondimento dello studio dei virus IBDV circolanti in Italia mediante la caratterizzazione genomica dei ceppi di IBDV isolati negli anni 2006-2009 per rilevare la comparsa di eventuali ceppi atipici.

Materiali e metodi

Campionamento

Lo studio è stato condotto su borse di Fabrizio di animali provenienti da allevamenti con sintomatologia clinica e/o lesioni riferibili a malattia di Gumboro. Le forme cliniche osservate erano, in generale, non molto gravi con edema o atrofia della borsa di Fabrizio e lieve aumento della mortalità. Solo in pochi casi è stata riportata mortalità elevata superiore al 6-7%. I materiali patologici provenivano da allevamenti di broiler e di pollastre da diverse regioni italiane raccolti nel periodo 2006-2009. In tutti gli allevamenti veniva applicata la vaccinazione con diversi ceppi attenuati di IBDV.

rt-PCR

I campioni sono stati testati per rilevare la presenza del genoma virale tramite la metodica rt-PCR descritta da Eterradossi (6). Detta metodica utilizza primers specifici che amplificano un frammento di 516bp del segmento A del genoma codificante la regione ipervariabile (HVR) della VP2.

Isolamento virale

I campioni risultati positivi alla rt-PCR sono stati in seguito inoculati in uova embrionate di pollo SPF di 9-11 g d'età sulla membrana corion-allantoidea per l'isolamento virale secondo la metodica descritta nel manuale OIE (8).

Sequenziamento ed analisi filogenetica

La caratterizzazione molecolare è stata condotta sui prodotti ottenuti dalla rt-PCR IBDV che corrispondono alla porzione del segmento A che codifica la HVR della VP2. Gli amplificati sono stati purificati mediante il Gel Extraction Kit (Qiagen), sequenziati con il BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit e sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state analizzate in BLAST e confrontate con quelle di ceppi di riferimento disponibili in GenBank mediante allineamento con il programma CLUSTAL W a parametri di default con il software Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Neighbor-joining con il programma MEGA 4.0.

Risultati

Negli ultimi 3 anni sono stati diagnosticati 92 casi di IBDV, 9 nel 2006, 23 nel 2007, 31 nel 2008 e 29 nel 2009. La caratterizzazione genomica è stata condotta su 83 ceppi, dei quali 18 isolati nel Veneto, 19 in Lombardia, 24 in Emilia Romagna, 1 in Trentino, 2 in Piemonte, 8 in Abruzzo, 3 in Molise, 3 in Marche, 3 in Puglia, 1 in Umbria ed 1 in Campania. Tutti i ceppi tranne 2 sono stati isolati da broiler con età comprese tra 24 e 52 giorni. I due restanti provengono da pollastre di 5-6 settimane di età.

L'analisi filogenetica comparativa delle sequenze dei ceppi italiani e dei ceppi di riferimento depositate in GenBank ha rilevato che il 60% (50/83) dei ceppi italiani circolanti nel 2006-2009 si collocano nel cluster dei ceppi vvIBDV. Il restante 40% (33) si divide in due gruppi. Un gruppo di 27 campioni comprende ceppi altamente correlati con i ceppi classici vaccinali. Gli altri 6 ceppi clusterizzano con i ceppi classici circolanti in Europa fino agli anni 80 ed i ceppi attenuati, ma formano comunque un gruppo chiaramente distinguibile. (figura n.1).

I ceppi di campo collegati ai ceppi IBDV vaccinali sono divisi in: 7 ceppi altamente correlati con il ceppo 228E; 12 con il ceppo Bursine 2; 2 col il ceppo Transmune e 6 ceppi con i ceppi D78 e Gumbovax.

Il confronto delle sequenze aminoacidiche dedotte dei ceppi di campo con i ceppi IBDV di riferimento ha evidenziato all'interno dei ceppi italiani vvIBDV un gruppo di 25 che presenta le 4 mutazioni aminoacidiche caratteristiche dei ceppi vvIBDV tipici (P222A, V256I, L294I, N299S) (3, 12,14). I restanti 25 ceppi presentano altre mutazioni. Un gruppo interessante è formato da 20 ceppi con una mutazione in posizione 254 (G254S) già osservata in precedenza in alcuni ceppi caratterizzati antigenicamente e genomicamente (9). La caratterizzazione antigenica, condotta con una metodica Antigen capture ELISA (AC-EL) utilizzando un pannello di 8 anticorpi monoclonali neutralizzanti (5, 6, 9), aveva rilevato che detta mutazione, seppur non localizzata all'interno dei picchi idrofili maggiori e minori, formava parte di un epitopo neutralizzante riconosciuto dal Mab 5. Tra questi 20 ceppi, 10 hanno anche delle mutazioni aa all'interno del picco idrofilico maggiore A: 5 in Y220F, stessa mutazione riscontrata nel ceppo vvIBDV atipico Egypt 99323 (7); 3 in Q221K ed infine 2 in D213N, mutazione osservata anche nella US variant E. Inoltre, un altro ceppo presenta una mutazione in pos 250 (Q250K) all'interno del picco idrofilico minore caratteristica di tutte le US variants.

Altri 3 ceppi presentano delle mutazioni aa localizzate in un'altra delle zone antigeniche importanti nel picco idrofilico maggiore B. Due ceppi possiedono la mutazione (A321T) riscontrata anche nel ceppo Egypt 99323 e la US variant GLS, mentre l'altro presenta la mutazione (K316R) presente nella US variant A.

L'analisi amminoacidica dei 6 ceppi correlati ai ceppi classici (F52/70) ha evidenziato la presenza di 8-12 aa diversi rispetto al ceppo classico F52/70; alcuni di questi sono caratteristici delle varianti americane.

Per quanto riguarda i ceppi correlati ai ceppi attenuati, i 6 ceppi del cluster 228E-like ed i 2 ceppi del cluster del ceppo Transmune-like presentano una identità amminoacidica del 100% con i ceppi attenuati 228E e Transmune rispettivamente. All'interno del gruppo dei ceppi di campo correlati al ceppo Bursine 2 si evidenziano delle variazioni aa (da 2 a 4 aa) rispetto al ceppo vaccinale. L'ultimo gruppo di ceppi correlati ai ceppi attenuati D78 e Gumbovax si caratterizza per la presenza di una mutazione in posizione 253 all'interno del picco idrofilico minore 1.

Discussione

Il principale scopo di questo lavoro è stato l'approfondimento dello studio genomico dei ceppi di IBDV circolanti in Italia dal 2006 al 2009 al fine di comparare la situazione epidemiologica attuale con quella riscontrata in precedenza negli anni 2002-2005 (9). Nel periodo 2006-2009 sono stati diagnosticati 92 casi di IBDV, dei quali 83 sono stati ulteriormente studiati tramite caratterizzazione genomica. I ceppi studiati sono rappresentativi della realtà avicola italiana in quanto provengono soprattutto da Lombardia, Veneto ed Emilia Romagna (61/83) ma anche da altri 8 regioni italiane (22/83). Tutti i casi riguardano allevamenti in cui la vaccinazione veniva applicata. I vaccini maggiormente utilizzati erano Gumbovax e Gumbovax plus (Merial), D78 e 228E (Intervet), Transmune (CEVAC) e Bursine2 (Fort Dodge); per questo motivo i ceppi vaccinali sono stati sequenziati e utilizzati come ceppi di riferimento nella analisi filogenetica.

Come negli anni precedenti è risultata prevalente la circolazione di ceppi vvIBDV ma, rispetto al passato, appare decisamente aumentata la presenza di ceppi cosiddetti “atipici” caratterizzati dalla presenza di mutazioni aminoacidiche all’interno della HVR VP2. Inoltre questi ceppi non sono stati identificati soltanto in Emilia Romagna come nel triennio precedente ma anche in altre regioni.

Va sottolineata l’individuazione di mutazioni aa localizzate nelle regioni antigeniche neutralizzanti, molte di queste sono state osservate anche nelle varianti americane. La rilevanza di questi cambiamenti appare decisamente elevata in quanto ad esse potrebbe essere attribuita la capacità di sfuggire all’azione neutralizzante degli anticorpi come già indicato per la variante americana GLS (12).

Altrettanto interessante appare l’aumento di ceppi dotati di una mutazione in posizione 254 già evidenziati negli anni precedenti (9). Questa mutazione si localizza vicino al picco idrofilico minore 1 e forma parte di un epitopo neutralizzante riconosciuto dal MAb 5 descritto da Eterradossi (5,6).

Di particolare importanza è il rilevamento di 27 ceppi correlati con i ceppi vaccinali, ma che, ad eccezione dei ceppi 228E-like, presentano differenze antigeniche verso i rispettivi ceppi attenuati. Considerato che molte di queste mutazioni si trovano in regioni che inducono la formazioni di anticorpi neutralizzati si potrebbe ipotizzare che si tratti di una conseguenza della pressione selettiva indotta dalla diffusione dalla vaccinazione.

Infine la presenza di 6 ceppi correlati al gruppo dei ceppi classici, ma chiaramente distinguibile da loro è da considerare di grande rilevanza. L’approfondimento delle caratteristiche di questi ceppi, in particolare la definizione del patotipo sarà oggetto di ulteriori studi.

1. Azad et al. (1987), *Virology*, 161 :145-152
2. Bayliss et al. (1990), *J Gen Virol*, 71, 659-677
3. Brown et al. (1994), *J Gen Virol*, 75 :675-680
4. Chettle et al. (1989), *Vet Rec*, 125 : 271-272
5. Eterradossi et al. (1997a), *Arch. Virol.*,142, 255-270
6. Eterradossi et al. (1997b), *Arch. Virol.*,142, 2079-2087
7. Eterradossi et al. (2004), *Avian Pathol.*, 33, 423-431
8. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (2008), OIE, Infectious bursal disease, chapter 2.3.12
9. Moreno et al. (2007), *Av Dis*, 51 :863-872
10. Schnitzler et al. (1993), *J Gen Virol*, 74 :1563-1571
11. Tosi et al. (2002), *Proc. Cost Action 839*, Lyon 2000, pp.21-27
12. Vakharia et al. (1994), *Virus Res*, 31:265-273
13. Van den Berg et al. (1996), *Av Pathol*, 25:751-768
14. Van den Berg et al. (2004), *Av Pathol*, 33(5):470-476

Legenda Albero

Relazioni filogenetiche tra le sequenze parziali della VP2 dei ceppi di IBDV isolati nel periodo 2006-2009 e ceppi di riferimento disponibili in GenBank. L’albero è stato costruito con il metodo Neighbor-joining mediante software MEGA4.

Solo valori di bootstrap >60% sono mostrati.

