

## ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO: CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI CIRCOLANTI IN ITALIA

Quaglia G.<sup>1</sup>, Mescolini G.<sup>1</sup>, Catelli E.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Muccioli F.<sup>3</sup>, Lupini C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO)*

<sup>2</sup> *CEVA Salute Animale, Agrate Brianza (MB)*

<sup>3</sup> *Medico Veterinario*

### Summary

Chicken Infectious Anaemia Virus (CIAV), a member of the genus *Gyrovirus*, is the etiological agent of a disease affecting chicken, named chicken infectious anaemia. The virus infects bone marrow-derived cells, resulting in severe anaemia and immunosuppression in young chickens and compromised immune response in older birds. This study reports the molecular characterization of 25 CIAV strains detected in Italian chickens of different production types, from environmental dust, feathers or tissues. Virus genomes were amplified by a Nested-PCR protocol targeting a partial sequence of the VP1 protein. Sequence and phylogenetic analysis showed that strains had heterogenic sequences clustering into genogroups II, IIIa, and IIIb, and possess aminoacidic residues peculiar of virulent strains. Only one CIAV strain had sequence very close to the vaccine strain (26P4) and could be classified as a vaccine-derived strain.

Viral DNA amplification was successfully obtained from non-invasive samples like feathers and environmental dust. These sampling protocols, being very convenient, deserve to be further investigated in terms of sensitivity for CIAV detection.

### INTRODUZIONE

*Chicken Infectious Anaemia Virus* (CIAV), agente eziologico dell'anemia infettiva del pollo, è un virus a DNA di piccole dimensioni, 2298 nucleotidi (nt), appartenente alla famiglia *Anelloviridae*, genere *Gyrovirus* (Rosario *et al.*, 2017). Il genoma è costituito da tre *Open Reading Frame* che codificano per tre proteine virali denominate: VP1, VP2 e VP3.

VP1 è la proteina del capsido (Renshaw *et al.*, 1996), con funzioni nella infezione e replicazione virale. Presenta una regione genomica ipervariabile costituita da 13 amminoacidi (aa) situata in posizione 139-151 (Noteborn *et al.*, 1991); importante per la caratterizzazione molecolare dei ceppi (Schat, 2003). Le proteine virali VP2 e VP3 sono non strutturali (Noteborn *et al.*, 1994).

L'infezione da CIAV provoca forma clinica quando avviene, sia per via verticale sia per via orizzontale, nelle prime settimane di vita. Il virus determina anemia aplastica e gli animali colpiti presentano depressione, atrofia del timo, del midollo osseo ed emorragie diffuse. Quando l'infezione avviene dopo le 3 settimane di età la malattia si manifesta prevalentemente in forma subclinica, causando una significativa immunosoppressione. Le cellule target del virus sono gli emocitoblasti nel midollo osseo e i precursori dei linfociti T nel timo (Balamurugan and Kataria, 2006). Ad oggi è conosciuto un unico sierotipo (Yuasa and Imai, 1986), tuttavia, sulla base della sequenza aa della VP1, è possibile distinguere all'analisi filogenetica 3 genotipi di

CIAV, denominati I, II e III (Ducatez *et al.*, 2006).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare dal punto di viste molecolare, ceppi di CIAV circolanti in Italia. Allo scopo è stato messo a punto un protocollo PCR nested per l'amplificazione ed il sequenziamento di una porzione genomica della VP1 e le sequenze ottenute sono state impiegate in analisi di sequenza e filogenetica.

## MATERIALI E METODI

### Campioni

Sono stati analizzati 25 ceppi di CIAV evidenziati negli anni 2018-2019 durante attività diagnostica di routine svolta dal Servizio di Patologia Aviaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, dell'università di Bologna. I campioni di partenza erano costituiti da polveri ambientali, tessuti, tamponi cloacali e penne da polli di diverse categorie produttive (Tabella 2).

**Tabella 2** Campioni positivi a CIAV oggetto di analisi molecolare.

CEPPO CIAV	Matrice	Categoria produttiva	Regione di provenienza
CIAV/IT/CK/855/17	Penne	Polli Rurali	Toscana
CIAV/IT/CK/906-06/18	Borsa di Fabrizio	Broiler	Veneto
CIAV/IT/CK/909-06/18	Penne	Broiler	Veneto
CIAV/IT/CK/1196/19	Tampone cloacale	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/986-1/18	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/986-2/18	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/986-6/18	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1099/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1100/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1101/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1153/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Abruzzo
CIAV/IT/CK/1155/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1157/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1179/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1180/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1185/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1186/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1187/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1188/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1189/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia
CIAV/IT/CK/1191/19	Polvere	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/1192/19	Polvere	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/1195/19	Polvere	Broiler	Emilia Romagna
CIAV/IT/CK/1201/19	Polvere	Broiler	Friuli Venezia Giulia

### Estrazione del DNA virale

L'estrazione del DNA virale dalle varie matrici in esame è stata eseguita utilizzando il kit del commercio NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL). Quando il campione in esame era costituito da polveri ambientali, prima dell'estrazione del DNA il campione è stato trattato come descritto da Mescolini *et al.*, (2019).

### PCR nested per CIAV

L'analisi molecolare per l'identificazione di CIAV è stata eseguita mediante un protocollo di PCR nested (Tabella 1).

**Tabella 1** Primer utilizzati nel protocollo di PCR nested per CIAV utilizzato per la caratterizzazione molecolare.

	SEQUENZA (5'-3')	POSIZIONE NEL GENOMA	DIMENSIONE AMPLIFICATO (bp)
CIAV 1 FOR	CAGGGTAAGCGAGCTAAAAG	751-770	1528
CIAV 1 REV	GCTGCGTTTATTGAGTGC	2262-2279	
CIAV 2 FOR	GGTACGTATAGTGTGAGGC	996-1014	790
CIAV 2 REV	GCTGTGAGTGTGCAAAGCT	1767-1786	

Per ogni reazione di PCR dal volume finale di 25 µl, veniva preparata la seguente mix di reazione: 0,5 µl di primer senso, 0,5 µl di primer antisenso, 5 µl 5X PCR GoTaq® *Reaction Buffer* (Promega); 0,125 µl di GoTaq® *DNA Polymerase* (Promega); 0,5 µl di dNTP (Promega); 11,625 µl di acqua per biologia molecolare. A tale mix andavano da ultimo aggiunti una goccia di olio minerale (SIGMA®) e 5 µl di DNA.

I cicli della PCR1 consistevano in: pre-denaturazione a 94°C per 2 min, 35 cicli di amplificazione caratterizzati da una fase di denaturazione (a 94°C per 1 min), una di appaiamento (a 50°C per 1 min) ed una di estensione 72°C per 1,30 min, seguita da una fase di estensione finale a 72°C per 5 min. I cicli della PCR2 erano uguali a quelli precedentemente descritti eccetto la fase di estensione che consisteva in 72°C per 40 sec.

### Analisi di sequenza e filogenetica

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio ExoSAP-IT™ *Express PCR Cleanup* (ThermoFisher Scientific), e successivamente sequenziati in entrambe le direzioni (Macrogen, Amsterdam, The Netherlands). 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 costruiti utilizzando l'algoritmo di Maximum Likelihood del software Mega X (Kumar *et al.*, 2018). I valori di bootstrap, ottenuti con 1.000 replicati, sono stati considerati significativi quando > di 70.

### RISULTATI

Da tutti i campioni esaminati sono stati ottenuti prodotti di amplificazione delle dimensioni attese. L'analisi delle sequenze amminoacidiche ha evidenziato nella VP1 residui precedentemente descritti come marker di virulenza o evidenziati in ceppi virulenti (Tabella 3) (Islam *et al.*, 2002).

**Tabella 3** Analisi della sequenza amminoacidica di ceppi CIAV ottenuti nella presente indagine e di ceppi di presenti sul database Genbank, in paragone con il ceppo vaccinale di riferimento Del-Ros USA(AF313470).

Posizione aa	Amminoacidi codificati										
	22	75	97	125	139	144	149	157	254	287	290
<b>CEPPI CIAV</b>											
Del-Ros USA(AF313470)	H	V	M	I	K	E	C	V	E	S	A
Cux-1-N (M55918)	.	.	.	.	.	D	.	.	G	A	.
Cux-1-M (M81223)	.	.	.	.	.	D	.	.	.	A	.
Nobilis P4 vaccine VP1 gene (AJ890284)	.	.	.	.	.	.	.	M	G	T	.
26P4 (D10068)	.	.	.	.	.	.	.	M	G	T	.
CAV/SLA3/13 VP1, Poland (KM458182)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/OPL3/13 VP1, Poland (KM458178)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
Australia (AF227982)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
BD-3 Bangladesh (AF395114)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/Ibadan.NIE/11.02/100, Nigeria (AJ888519)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CAV/Lanlate.NIE/11.02/71, Nigeria (AJ888528)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
Vaccine strain 3711/ck/Australia (EF683159)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AH6, China (DQ124935)	Q	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV isolate 8, Taiwan (KJ728819)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
G17.33.3, Vietnam (MH536104)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
HLJ15108, China (KY486137)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
SD1511, China (KU641015)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	P
SD1514, China (KU645521)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
SD1518, China (KU645522)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
69 VP1, Slovenia (DQ016140)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
98D02152, Alabama (AF311892)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
1106TN05, Taiwan (KY888897)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV-EG-2, Egypt (MH001553)	Q	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.

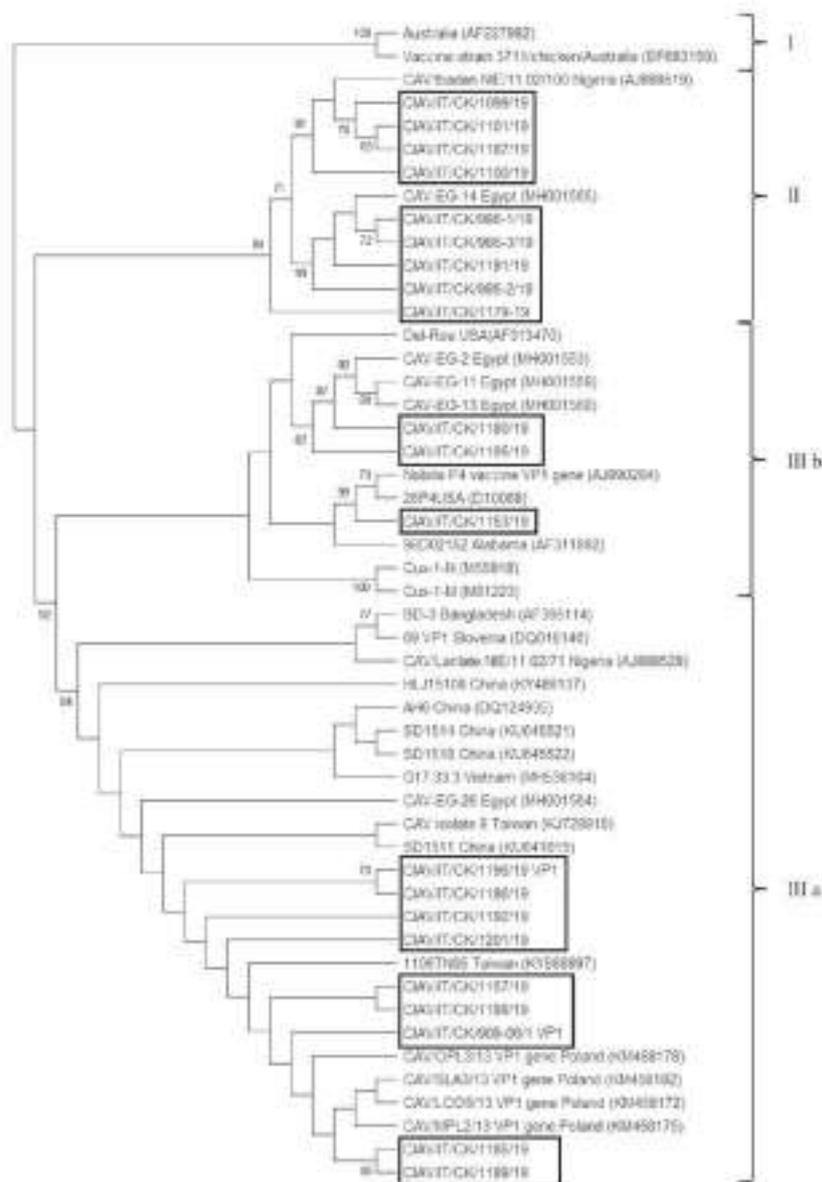
CAV-EG-14, Egypt (MH001565)	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	P
CAV-EG-11, Egypt (MH001559)	Q	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.
CAV-EG-13, Egypt (MH001560)	Q	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.
CAV-EG-26, Egypt (MH001564)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/LOD5/13 Poland (KM458172)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CAV/MPL2/13, Poland (KM458175)	N	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/909-06/1 VP1	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1196/19 VP1	.	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/986-1/18	-	I	L	L	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/986-2/18	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/986-3/18	-	I	L	L	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/1099/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1100/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1101/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1153/19	-	.	.	.	.	.	M	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1157/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1179/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1180/19	-	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.
CIAV/IT/CK/1185/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1186/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1187/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	.
CIAV/IT/CK/1188/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1189/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1191/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	T	P
CIAV/IT/CK/1192/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.
CIAV/IT/CK/1195/19	-	.	L	.	Q	Q	M	.	.	.	.
CIAV/IT/CK/1201/19	-	I	L	.	Q	Q	.	.	.	A	.

- sequenza non disponibile

. residuo amminoacidico uguale al ceppo di riferimento Del-Ros USA(AF313470).

Il ceppo denominato CIAV/IT/CK/1153/19 ha mostrato un profilo aa con identità aminoacidica del 99,1% con il ceppo vaccinale 26P4. L'analisi filogenetica ha rivelato una certa eterogeneità molecolare dei ceppi analizzati che si raggruppano in cluster distinti sia con ceppi del genotipo II sia del genotipo III (Ducatez *et al.*, 2006) (Figura 1).

**Figura 1** Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche dei ceppi CIAV analizzati nel presente studio (evidenziati nei riquadri in grassetto) e di ceppi di riferimento presenti sul database Genbank.



## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro vengono per la prima volta caratterizzati ceppi CIAV provenienti da diverse aree geografiche Italiane. L'amplificazione del DNA virale è stata ottenuta con successo, oltre che da matrici convenzionali quali organi, anche da penne e, soprattutto da polveri ambientali. Queste ultime modalità di campionamento non sono invasive e risultano essere di facile esecuzione (Davidson, 2019), per cui meritano di essere ulteriormente studiate essendo valide alternative ai campionamenti tradizionali. L'analisi filogenetica, condotta sulla proteina VP1, ha mostrato eterogeneità genetica nei ceppi esaminati che risultano appartenere ai genotipi II, IIIa e IIIb (Ducatez *et al.*, 2006) o anche, in un caso, essere di origine vaccinale. L'analisi di sequenza ha inoltre mostrato la presenza di sostituzioni amminoacidiche già descritte in bibliografia, peculiari dei ceppi virulenti (Islam *et al.*, 2002). Futuri studi tesi ad ottenere la sequenza completa del genoma dei CIAV circolanti in Italia potranno fornire nuovi dati, in grado di confermare quanto evidenziato dalla parziale caratterizzazione della VP1.

## BIBLIOGRAFIA

1. Balamurugan, V. and Kataria, J. M., (2006). Economically important noncongenic immunosuppressive viral diseases of chicken—current status. *Veterinary Research Communications*, 30(5), 541–566.
2. Brown H. K., Browning G. F., Scott P. C., Crabb B. S. (2000). Full-length infectious clone of a pathogenic Australian isolate of chicken anaemia virus. *Aust. Vet. J.* 78(9):637-40.
3. Davidson I. (2019). Biotic concerns in generating molecular diagnosis matrixes for 4 avian viruses with emphasis on Marek's disease virus. *J Virol Methods*. [Epub ahead of print].
4. Ducatez M. F., Owoade A. A., Abiola J. O., Muller C. P. (2006). Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch. Virol.* 151:97-111.
5. Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D., Muller H. (2002). Sequence Analysis of the Full Length Cloned DNA of a Chicken Anaemia Virus (CAV) Strain from Bangladesh: Evidence for Genetic Grouping of CAV Strains Based on the Deduced VP1 Amino Acid Sequences. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49:332-337.
6. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). *Molecular Biology and Evolution.* 35:1547-1549.
7. Li Y., Fang L., Cui S., Fu J., Li X., Zhang H., Cui Z., Chang S., Shi W., Zhao P. (2017). Genomic characterization of recent chicken Anemia virus isolates in China. *Front. Microbiol.* 8, 401.
8. Mescolini G., Lupini C., Quaglia G., Berto G., Tovani A., Ceroni S., Muccioli F., Catelli E. (2019). Monitoraggio ambientale della circolazione del virus della Malattia di Marek in allevamenti di broiler e di riproduttori pesanti. *Atti della Società Italiana di Patologia Aviaria 2019. IV Simposio Scientifico, Bologna 22 Novembre 2019.*
9. Noteborn M. H., de Boer G. F., van Roozelaar D. J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J. G., van der Eb A. J. (1991) Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology*, 65, 3131-3139.

10. Noteborn M. H., Todd D., Verschueren C.A., de Gauw H.W., Curran W.L., Veldkamp S., Douglas A.J., McNulty M.S., van der Eb A.J., Koch G. (1994). A single chicken anemia virus protein induces apoptosis. *Journal of Virology*, 68:346-351.
11. Renshaw, R. W., Soiné, C., Weinkle, T., O'Connell, P. H., Ohashi, K., Watson, S., Lucio B., Harrington S., Schat K.A. (1996). A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J. Virol.* 70, 8872–8878.
12. Rosario K., Breitbart M., Harrach B. (2017). Revisiting the taxonomy of the family *Circoviridae*: establishment of the genus *Cyclovirus* and removal of the genus *Gyrovirus*. *Arch. Virol.* 10.1007/s00705-017-3247-y.
13. Schat K.A. (2003). Chicken infectious anemia. In: Saif Y.M., editor. *Diseases of poultry*. Iowa: Iowa State Press; 2003. p. 182–202.
14. Yamaguchi S., Imada T., Kaji N., Mase M., Tsukamoto K., Tanimura N., Yuasa N. (2001). Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J. Gen. Virol.* 82:1233-1238.
15. Yuasa N., Imai K. (1986). Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* 15:639-645.