

# STUDIO DELLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELLA BURSITE INFETTIVA NEGLI ALLEVAMENTI DI POLLASTRE DELLA LINEA OVAIOLA DA CONSUMO NEL PERIODO MAGGIO - SETTEMBRE 2019

Gambi L.<sup>1</sup>, Berto G.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>1</sup>, Koutoulis K.<sup>3</sup>, Barbieri I.<sup>4</sup>, Massi P.<sup>1</sup>, Tosi G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede Territoriale di Forlì, Via Don Eugenio Servadei 3E/3F, 47122 Forlì (FC), Italia;

<sup>2</sup> Azienda ULSS 8 Berica - Viale Ridolfi 37 - 36100 Vicenza, Italia;

<sup>3</sup> Ceva Santé Animale, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne– France;

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Tecnologie Biologiche Applicate, Via A.Bianchi 9, 25124 Brescia (BS), Italia.

## Summary

Infectious bursal disease virus (IBDV) is the causative agent of the acute and highly contagious infectious bursal disease (IBD). IBD is one of the economically most important diseases that affects commercially produced chickens worldwide. Vaccination is widely used to control IBD in boiler chickens and in rearing pullets. Different IBDV vaccines are available in Italy including: conventional live and inactivated vaccines, IBDV immune complex vaccines and live viral vector vaccines. In Italy the occurrence and the circulation of IBDV field strains has been investigated, during the last years, especially in boiler chickens and less investigated in egg-table rearing pullets. This study reports the results of a survey conducted on 19 egg-table rearing pullet farms (27 flocks). None of the flocks involved in the study was affected by field outbreaks of IBD, but field strains belonging to very virulent IBDV strains group were detected in 6 tested flocks (from 4 farms) at 6 weeks of age. IBDV field strains were not detected at 12 weeks of age. Based on the results of this study, IBDV continues to be a major threat to commercial poultry, including egg-table rearing pullet farms. Along with strict biosecurity and hygiene management in poultry farms, vaccination is still necessary to control the disease.

## INTRODUZIONE

Il virus della bursite infettiva (IBDV), agente eziologico della bursite infettiva del pollo (IBD), appartiene alla Famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus* e provoca un'infezione altamente contagiosa nel pollo, soprattutto fra 3 e 6 settimane di vita (4). Possiede tropismo linfatico prediligendo come sede di infezione la borsa di Fabrizio, dove provoca una grave deplezione linfocitaria. L'importanza economica della malattia che ne consegue è legata all'azione patogena diretta del virus (in grado di provocare significativi indici di mortalità) e ai suoi effetti immunodepressivi con conseguente maggiore sensibilità dei gruppi colpiti ad infezioni secondarie e minore risposta immunitaria alle vaccinazioni. Sono stati identificati due sierotipi di IBDV, denominati 1 e 2, di cui solamente il primo è riportato come patogeno nel pollo. A questo sierotipo appartengono diverse varianti classificate da un punto di vista genomico o patogenico: tra questi sono annoverati i ceppi "classici", le varianti immunosoppressive e i ceppi "very virulent" (*vvIBDV*). Il controllo della malattia in allevamento, anche a causa dell'elevata resistenza del virus a diversi agenti chimici e fisici, si basa sulla profilassi vaccinale. Esistono diverse tipologie di presidi

immunizzanti: vaccini vivi attenuati somministrati in allevamento, ad immunocomplessi (vaccino vivo attenuato legato ad anticorpi specifici nei confronti del virus), vettori virali (Herpesvirus del tacchino – HVT) ingegnerizzati in modo da esprimere la proteina di superficie VP2 di IBDV (9). Scopo del presente lavoro è la raccolta di dati sulla circolazione di ceppi di campo di IBDV in allevamenti di pollastre future ovaiole da consumo sottoposti a differenti programmi vaccinali.

## **MATERIALI E METODI**

### *Gruppi oggetto dello studio e campionamento*

Lo studio è stato condotto tra maggio e settembre del 2019 e ha riguardato un totale di 19 allevamenti di pollastre (dei quali 17 in Emilia Romagna, 1 in Veneto e 1 nelle Marche) future galline ovaiole da consumo. I campionamenti sono stati effettuati a 1 giorno di vita (15 pulcini/gruppo), a 6 e a 12 settimane di età (10 soggetti/gruppo). Da 7 allevamenti sono stati campionati più gruppi a causa della presenza, nello stesso allevamento, di linee genetiche diverse. In sede di prelievo sono state raccolte informazioni anamnestiche quali: il numero di animali presenti in allevamento e nei singoli capannoni sottoposti a campionamento, la tipologia di allevamento (ad esempio in gabbia o a terra), le linee genetiche allevate, gli indici di mortalità e i programmi vaccinali nei confronti di IBDV. I soggetti di un giorno di vita sono stati sottoposti a prelievo di sangue per la valutazione dell'immunità materna; gli animali di 6 e 12 settimane di età sono stati soppressi per dislocazione cervicale e sottoposti all'esame necroscopico per la valutazione di eventuali lesioni macroscopiche riferibili a IBD e per il prelievo delle borse di Fabrizio da sottoporre alla ricerca del virus mediante RT-PCR. Nei gruppi considerati dallo studio è stato inoltre condotto un regolare monitoraggio, su base clinica e anatomo-patologica, per evidenziare l'eventuale comparsa di segni clinici e di lesioni macroscopiche riferibili a IBD.

### *Estrazione dell'RNA virale ed RT – PCR*

Le borse di Fabrizio prelevate in sede necroscopica sono state sottoposte ad RT-PCR per la ricerca di IBDV. Per ogni gruppo di animali sono stati testati due pool da 5 borse di Fabrizio ciascuno, omogenati in 7 ml di *Phosphate-buffered saline* (PBS). Da questi si è proceduto con l'estrazione dell'RNA virale utilizzando il kit commerciale QIAampViral RNA® (Qiagen) seguendo le istruzioni della casa produttrice. La reazione di RT-PCR è stata eseguita secondo quanto descritto da Etteradossi et al. (3), che consente di amplificare un frammento di 516 pb del gene codificante per la VP2 di IBDV, situato nella regione ipervariabile della stessa.

### *Sequenziamento*

I prodotti della RT-PCR sono stati sottoposti a sequenziamento diretto con gli stessi primers usati per l'amplificazione mediante metodo Sanger utilizzando la chimica dei Big Dye terminator v1.1 e successiva elettroforesi capillare su sequenziatore automatico 3500x1 (Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state assemblate ed editate con il programma Lasergene (DNASar). Il confronto delle sequenze con il pannello di ceppi di riferimento utilizzati in routine e di ceppi disponibili in GenBank è stato effettuato mediante allineamento multiplo con il programma MEGA 5. I ceppi sono stati confrontati con ceppi disponibili in GenBank e con le sequenze dei ceppi vaccinali registrati in Italia.

### *Sierologia*

Per la ricerca degli anticorpi materni nei pulcini di un giorno di vita è stato impiegato un test ELISA commerciale (IDEXX IBD™- US). Il test è stato eseguito secondo le istruzioni fornite dal produttore e i risultati sono stati espressi in titolo come indicato dal produttore del test. Per la stima dell'età ottimale di vaccinazione (nei gruppi che hanno impiegato ceppi vaccinali vivi attenuati in allevamento) è stata utilizzata la metodica descritta da De Wit J.J. (la cosiddetta "Deventer formula") (2).

### **RISULTATI**

Sono state campionate 810 pollastre appartenenti a 27 gruppi differenti, per un totale di 854100 animali coinvolti nello studio. La metà dei gruppi era allevata in gabbia (=15), mentre 9 gruppi erano allevati a terra e 3 in voliera. La linea genetica più rappresentata era Lohmann Brown (=11) seguita da Hy-line Brown (=10); sono stati anche campionati gruppi di animali appartenenti alle linee genetiche Novogen (=2) Hy-line W36(=2), Tetra bianche(=1) e Tetra rosse (=1). Anche la vaccinazione nei confronti di IBDV mostra una distribuzione quasi paritaria della tipologia di vaccini impiegati: in 16 gruppi è stato somministrato un vaccino vivo "vettorizzato" a 1 giorno di vita in incubatoio (13 gruppi vaccinati con il vaccino rHVT-IBD e 3 gruppi vaccinati con il vaccino rHVT-ND-IBD); in 11 gruppi è stato invece adottato uno schema vaccinale basato sulla somministrazione di due vaccini vivi attenuati in acqua di bevanda di cui il primo di tipo "intermediate-plus" (ceppo 228E) e il secondo di tipo "intermediate" (ceppo D78). Infine, gli indici di mortalità rilevati nel periodo considerato dallo studio sono stati variabili, con valori minimi dello 0,20% fino al 5,60% ad una settimana di vita; alla dodicesima gli indici di mortalità complessivi erano compresi tra 0,38% e 6,61%. Nel periodo considerato dallo studio non sono stati osservati segni clinici e/o lesioni macroscopiche riferibili a IBD, anche nei gruppi (tre in tutto) che hanno presentato indici di mortalità superiori alla media degli altri gruppi. Dei 27 gruppi testati, 20 sono risultati positivi a IBDV mediante RT-PCR: di questi, 18 durante la sesta settimana di vita, mentre in due gruppi la positività si è confermata anche durante la dodicesima settimana. I risultati del sequenziamento hanno evidenziato la presenza di 8 ceppi con un'elevata omologia genetica nei confronti di uno dei ceppi vaccinali vivi attenuati impiegati in allevamento (228E); 6 ceppi hanno presentato una omologia genetica del 100% nei confronti della VP2 inserita nel vettore virale HVT del vaccino rHVT-IBD, mentre 6 ceppi hanno presentato la maggiore omologia genetica nei confronti del ceppo DV86, considerato uno dei ceppi prototipo dei vvIBDV. Il dettaglio dei risultati ottenuti è riportato nella tabella 1. I valori stimati dell'età ottimale di vaccinazione (sulla base dei livelli di immunità materna rilevati ad un giorno di vita) nei gruppi vaccinati con ceppi vivi attenuati in allevamento sono riportati in tabella 2.

### **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

La bursite infettiva (IBD) resta una delle patologie aviari più temibili sia a causa dell'azione diretta del virus (che può causare elevati indici di mortalità) che dei suoi effetti immunodepressivi. Il controllo della malattia si basa sull'adozione di rigorose misure igienico-sanitarie e di biosicurezza e sull'applicazione di

programmi vaccinali. L'introduzione, nel nostro paese, di differenti tipologie di vaccini nei confronti di IBDV ha determinato, soprattutto nei gruppi di pollastre future ovaiole da consumo, una certa diversificazione dei programmi vaccinali e del tipo di vaccino impiegato. Lo scopo del presente studio non era tuttavia la valutazione dell'efficacia dei piani vaccinali, ma lo studio della circolazione di ceppi di campo in gruppi di pollastre distribuiti soprattutto in Emilia Romagna. E' stata scelta questa tipologia produttiva in quanto meno investigata, da questo punto di vista, rispetto al pollo da carne (5,6,7,8). I risultati dello studio hanno evidenziato la circolazione di ceppi di campo di IBDV assimilabili, su base genetica, al ceppo DV86, considerato uno dei ceppi prototipo dei vvIBDV. Pur non essendo state eseguite valutazioni sulla patogenicità dei ceppi rilevati, si può ipotizzare che i programmi vaccinali adottati nei gruppi risultati positivi ai ceppi di campo siano stati in grado di controllare la comparsa della malattia. Nei gruppi considerati non sono stati rilevati ceppi di campo appartenenti ad altri genotipi, come ad esempio il gruppo "ITA" descritto nel nostro paese in gruppi da carne (1). Per quanto riguarda la persistenza dei ceppi vaccinali nella borsa di Fabrizio, in 4/13 gruppi vaccinati con il vaccino rHVT-IBD è stata rilevata, a 6 settimane di età, una sequenza con omologia del 100% nei confronti della VP2 inserita nel ceppo vaccinale. In 2 gruppi la positività si è confermata anche a 12 settimane di età. In 8/11 gruppi vaccinati con vaccini vivi attenuati in allevamenti è stata rilevata, solo a 6 settimane di età, una sequenza fortemente correlata ad uno dei due ceppi utilizzati, il ceppo 228E. Tale riscontro confermerebbe la maggiore capacità "colonizzatrice" della borsa di Fabrizio del ceppo 228E ("intermediate-plus") rispetto al ceppo D78 ("intermediate"). Nel corso dello studio è stata condotta anche un'indagine sierologica a 1 giorno di vita e a 6 e 12 settimane di età che non viene riportata nel presente lavoro in quanto sarà oggetto di uno studio più ampio. Nel presente lavoro è stata stimata "a posteriori", sulla base dei livelli di immunità materna, l'età ottimale di somministrazione dei ceppi 228E e D78 che, com'è noto, possono risentire negativamente, e in funzione del loro grado di attenuazione, della presenza di elevati livelli di anticorpi materni. In tutti i gruppi considerati i ceppi vivi attenuati sono stati somministrati con un certo anticipo rispetto alla stima calcolata sulla base della "formula di Deventer". In questi gruppi non è stato dimostrato un "challenge" con ceppi di campo e quindi non è possibile stabilire se le tempistiche di vaccinazione decise dalle singole aziende siano state comunque efficaci. Tuttavia una maggior attenzione ai livelli anticorpali materni potrebbe risultare utile nella scelta del programma vaccinale.

In conclusione i risultati dello studio hanno evidenziato la costante circolazione di ceppi di campo di IBDV potenzialmente virulenti anche nel settore delle pollastre future ovaiole da consumo e, di conseguenza, la necessità di adottare accurati programmi vaccinali in aggiunta alle misure di profilassi igienico-sanitaria e alla biosicurezza.

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

Gruppo n.	Piano vaccinale	RT-PCR (6 settimane)	Sequenziamento <sup>1</sup> (6 settimane)	RT-PCR (12 settimane)	Sequenziamento <sup>1</sup> (12 settimane)
1	rHVT-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
2	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,4%)	NEG	//
3	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
4	228E + D78 (14gg/21gg)	NEG	//	NEG	//
5	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	NEG	//
6	rHVT-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
7	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,1%)	NEG	//
8	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,3%)	NEG	//
9	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
10	228E + D78 (17gg/26gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
11	228E + D78 (17gg/26gg)	NEG	//	NEG	//
12	228E + D78 (14gg/21gg)	NEG	//	NEG	//
13	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)
14	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,1%)	NEG	
15	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)
16	rHVT-ND-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
17	228E + D78 (15gg/28gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
18	228E + D78 (15gg/28gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
19	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,1%)	NEG	//
20	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,5%)	NEG	//
21	rHVT-ND-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
22	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
23	228E + D78 (14gg/25gg)	POS	228E (99,6%)	NEG	//
24	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	DV86 (96,5%)	NEG	//
25	rHVT-ND-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
26	rHVT-IBD (incubatoio)	NEG	//	NEG	//
27	rHVT-IBD (incubatoio)	POS	VP2 vaccino rHVT-IBD (100%)	NEG	//

<sup>1</sup> Viene riportato il ceppo con la più elevata omologia genetica (espressa in %) rispetto ai ceppi confrontati (GenBank e ceppi vaccinali di riferimento)

**Tabella 2.** Stima dell'età ottimale di vaccinazione nei gruppi vaccinati con ceppi 228E e D78.

Gruppo n.	Età vaccinazione 228E (gg)	Età ottimale stimata 228E (gg)		Età vaccinazione D78 (gg)	Età ottimale stimata D78 (gg)	
		75% <sup>1</sup>	90% <sup>1</sup>		75% <sup>1</sup>	90% <sup>1</sup>
2	14	24/25	29	25	35/36	40
3	14	24	26/27	25	35	37/38
4	14	27	28	21	38	39
9	14	21/22	23/24	25	32/33	34/35
10	17	25/26	27/28	26	36/37	38/39
11	17	25/26	26/27	26	36/37	37/38
12	14	24/25	25	21	35/36	36
17	15	27/28	29	28	38/39	40
18	15	24/25	27	28	35/36	38
22	14	23	24	25	34	35
23	14	25	26	25	36	37

<sup>1</sup> viene riportata l'età in cui si stima che il 75% oppure il 90% del gruppo abbia livelli di immunità materna non più in grado di interferire con i ceppi vaccinali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bonci M., Giovanardi D., Pesente P., Morandini E., Lupini C., Cecchinato M., Rossi G., Catelli E. (2013). Caratterizzazione molecolare di ceppi del virus della bursite infettiva isolati recentemente in Italia. Atti del LII convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.136-141.
2. De Wit J.J. (2001). Gumboro disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Annual report and proceedings of COST action 839: immunosuppressive viral diseases in poultry pp.171-178. European Commission-Directorate General for research.
3. Etteradossi N., Arnauld C., Tekaia F., Toquin D., LeCoq H., Rivallan G., Guittet M., Domenech J., Van denBerg T.P., Skinner M.A. (1999). Antigenic and genetic relationships between european veryvirulent infectious bursal disease viruses and an early west african isolate. *Avian Pathology* 28:36-46.
4. Etteradossi, N. e Saif, Y.M. Infectious Bursal Disease. [aut. libro] Y.M. Saif. *Diseases of Poultry 12th Edition*. Oxford, UK : Blackwell Publishing, 2008, p. 1324.
5. Lupini C., Mescolini G., Quaglia G., Silveira F., Felice V., Catelli E. (2018). Indagine di campo sulla circolazione di virus immunosoppressivi nel pollo da carne. Atti del LVII convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.135-137
6. Lupini C., Felice V., Bonci M., Listorti V., Laconi A., Cecchinato M., Morandini E., Catelli E. (2015). Dati epidemiologici sulla circolazione in Italia del nuovo genotipo IBDV ITA. Atti del LIV convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.201-205.
7. Massi P., Fiorentini L., Barbieri I., Casadio M., Tosi G. (2014). Identificazione mediante sequenziamento genomico dei ceppi di virus della malattia di Gumboro (IBDV) isolati nel pollo da carne in Italia e in paesi esteri negli anni 2012, 2013 e 2014. Atti del LIII convegno annuale della società italiana di patologia aviare (SIPA) pp.155-167.
8. Moreno Martin A., Fallacara F., Barbieri I., Tosi G., Rivallan G., Etteradossi N., Ceruti R., Cordioli P. (2007). Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005. *Avian Diseases* 51:863-872.
9. Muller H, Mundt E., Etteradossi N., Islam M.R. (2012). Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology* 41:133-139.