

CIRCOLAZIONE DEL VIRUS DELL'ANEMIA INFETTIVA DEL POLLO NEL BACINO DEL MEDITERRANEO

Quaglia G.¹, Mescolini G.¹, Di Francesco A.¹, Catelli E.¹, Salvatore D.¹, Prentza Z.^{2,3}, Sakhria S.⁴, Berto G.⁵, Muccioli F.⁶, Koutoulis K.², Papparonis T.³, Ben Chehida N.⁴, Lupini C.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO);*

² *Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Science, University of Thessaly, Karditsa, Greece;*

³ *Agricultural Poultry Cooperation of Ioannina "PINDOS", Rodotopi, Ioannina, Greece;*

⁴ *University of Tunis El Manar, Institute of Veterinary Research of Tunisia, Tunis, Tunisia;*

⁵ *Azienda Alss 8 Berica, Vicenza;*

⁶ *Martini S.p.A., Budrio di Longiano (FC)*

Summary

Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV), a member of the genus *Gyrovirus*, is the etiological agent of a disease affecting chicken, named chicken infectious anemia. The virus infects bone marrow-derived cells, resulting in severe anemia and immunosuppression in young chickens and compromised immune response in older birds. This study reports the molecular characterization of 53 CIAV strains detected in Italian, Greece and Tunisian chickens of different production types, from environmental dust, cloacal swabs, feathers or tissues. Samples were examined by a nested-PCR protocol targeting a partial sequence of the VP1 gene of CIAV; subsequently the amplification of the complete genome of selected positive sample was attempted. Sequence and phylogenetic analysis of VP1 showed that Italian and Greece strains had heterogenic sequences clustering into genogroups II, IIIa, and IIIb, and possess aminoacidic residues peculiar of virulent strains; Tunisian CIAV strains detected during the study clustered with CIAV strains previously detected in Tunisia, belonging to genogroup II. 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 Anemia 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), frequentemente esaminata in corso di studi di caratterizzazione molecolare virale (Schat, 2003). Le pro-

teine virali VP2 e VP3 sono non strutturali (Noteborn *et al.*, 1994). La proteina VP2 è implicata nella replicazione virale e nella virulenza (Peters *et al.*, 2006), mentre la proteina VP3, anche chiamata apoptina, induce apoptosi in cellule linfoblastoidi T e cellule mieloidi (Noteborn *et al.*, 1994).

CIAV si trasmette per via verticale ed orizzontale e l'infezione è in grado di provocare una forma clinica quando si verifica nelle prime settimane di vita. Il virus determina anemia e gli animali colpiti presentano depressione, atrofia del timo e 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 solo una significativa immunosoppressione, che ovviamente accompagna anche la forma clinica. 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 di CIAV (Yuasa and Imai, 1986), tuttavia, sulla base della sequenza nucleotidica della VP1 ed all'analisi filogenetica, è possibile distinguere 4 genogruppi (Ducatez *et al.*, 2006; Ou *et al.*, 2018).

L'obiettivo del presente lavoro è stato caratterizzare dal punto di vista molecolare, mediante sequenziamento della VP1 o del genoma completo, ceppi CIAV provenienti da Grecia, Tunisia ed Italia. I campioni di origine erano costituiti da diverse matrici biologiche raccolte da allevamenti di polli di diversi indirizzi produttivi.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 216 campioni provenienti dall'Italia (45), dalla Grecia (36) e dalla Tunisia (135), costituiti da organi, tamponi cloacali, penne e polvere ambientale, prelevati da allevamenti intensivi di polli da carne e di riproduttori pesanti, e da allevamenti rurali.

Estrazione del DNA virale

L'estrazione del DNA virale 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

Sul DNA estratto è stata eseguita una PCR nested per amplificare parte del gene codificante la VP1 seguendo il protocollo descritto di seguito ed utilizzando i primer riportati in Tabella 1. 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 estratto dal campione.

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 di 72°C per 40 sec.

Tabella 1. Primer utilizzati nel protocollo di PCR nested per CIAV.

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

Amplificazione del genoma completo di CIAV

Al fine di ottenere l'amplificazione del genoma completo di CIAV, i campioni provenienti da Italia e Tunisia risultati positivi alla PCR nested per CIAV, sono stati sottoposti a 3 PCR *overlapping* utilizzando i *primers* disegnati Li et al. (2017).

Analisi di sequenza e filogenetica

Gli amplificati sono stati purificati utilizzando il kit del commercio ExoSAP-ITTM *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. Con le sequenze nucleotidiche della VP1, parziale per i ceppi della Grecia e completa per i ceppi italiani e tunisini, sono stati costruiti 3 alberi filogenetici, distinti per area geografica, utilizzando l'algoritmo di Neighbor-joining 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

Su un totale di 213 campioni esaminati, 53 (25 dei quali provenienti dall'Italia, 13 dalla Grecia e 15 dalla Tunisia) sono risultati positivi alla nested-PCR per CIAV (Tabella 2); da tutti prodotti di PCR è stata ottenuta con successo la sequenza della porzione del gene VP1 amplificata; da tutti i campioni provenienti dalla Tunisia, e da 11 campioni italiani, è stato possibile ottenere l'amplificazione e la sequenza del genoma completo.

Tabella 2. Campioni provenienti da Italia, Tunisia e Grecia risultati positivi a PCR nested per CIAV: Matrici biologiche e categorie produttive.

CEPPO CIAV	Matrici	Categoria produttiva	Origine
CIAV/IT/CK/855/17	Penne	Polli Rurali	Italia
CIAV/IT/CK/906-06/18	Borsa di Fabrizio	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/909-06/18	Penne	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1196/19	Tampone cloacale	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/986-1/18	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/986-2/18	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/986-6/18	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1099/19	Polvere	Broiler	Italia

CIAV/IT/CK/1100/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1101/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1153-1/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Italia
CIAV/IT/CK/1153-2/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Italia
CIAV/IT/CK/1155/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1157/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1179/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1180/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1185/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1186/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1187/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1188/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1189/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1191/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1192/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1195/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/IT/CK/1201/19	Polvere	Broiler	Italia
CIAV/GR/CK/1410/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1416/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1422/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1412/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1418/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1424/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1414/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1420/19	Polvere	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1344/19	Milza e fegato	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1349/19	Milza e fegato	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1351/19	Milza e fegato	Riproduttori Pesanti	Grecia
CIAV/GR/CK/1426/19	Polvere	Broiler	Grecia
CIAV/GR/CK/1428/19	Polvere	Broiler	Grecia
CIAV/TN/7-1	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-2	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-3	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-4	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-5	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-6	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-7	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-8	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-9	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-10	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-11	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-12	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-13	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-14	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia
CIAV/TN/7-15	Tampone cloacale	Polli Rurali	Tunisia

L'analisi filogenetica condotta sulla sequenza nucleotidica della proteina VP1 ha rivelato una certa eterogeneità molecolare dei ceppi CIAV circolanti in Italia ed in Grecia (Figura 1) che clusterizzano con ceppi del genogruppo II e del genogruppo IIIa e IIIb. I ceppi di CIAV evidenziati in Tunisia, tutti ottenuti da polli rurali (Figura 2) hanno mostrato identità molecolare con ceppi precedentemente isolati in Tunisia nel 2009 e nel 2013, appartenenti al genogruppo II (Nsiri, 2009, 2013).

Figura 1. Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche parziali del gene VP1 di ceppi CIAV identificati in Grecia ed analizzati nel presente studio (marcati con triangolo rosso) e di ceppi di riferimento presenti sul database *GenBank*.

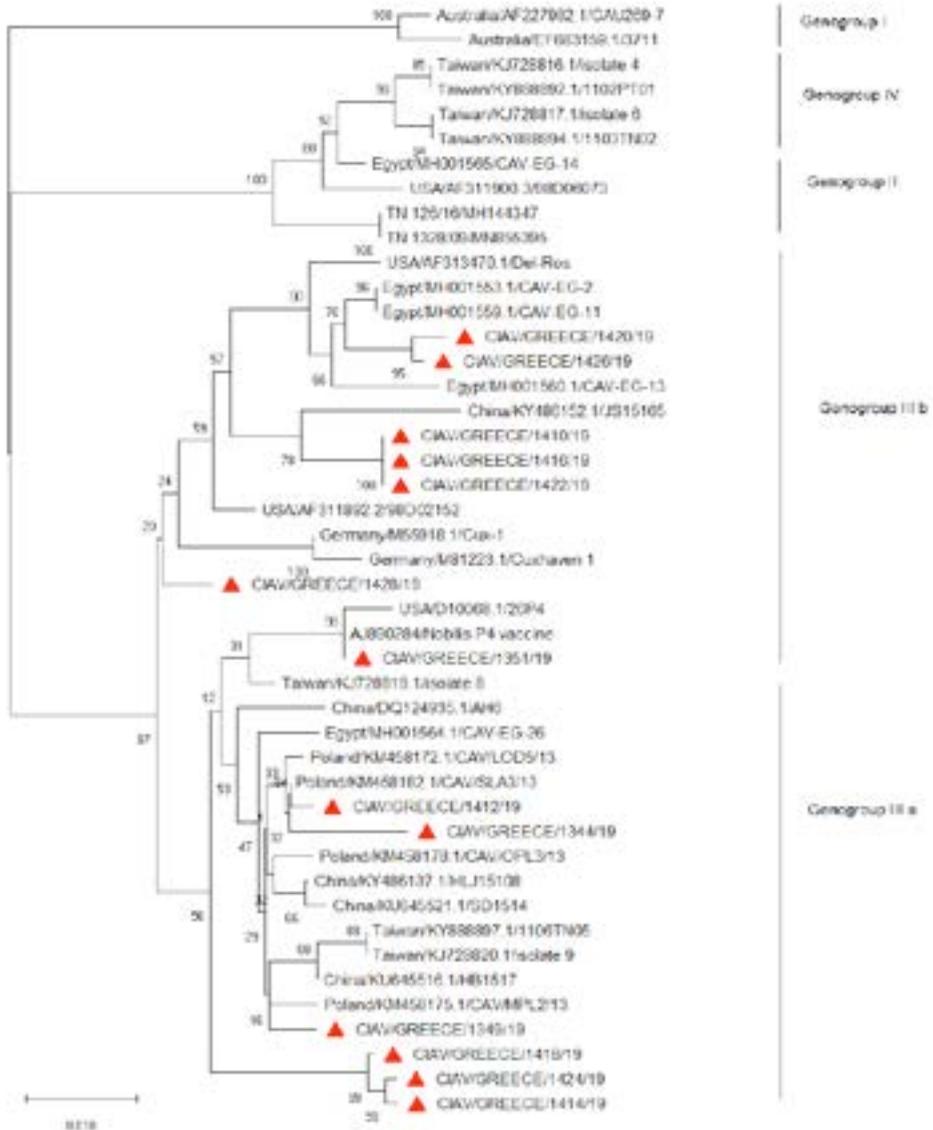
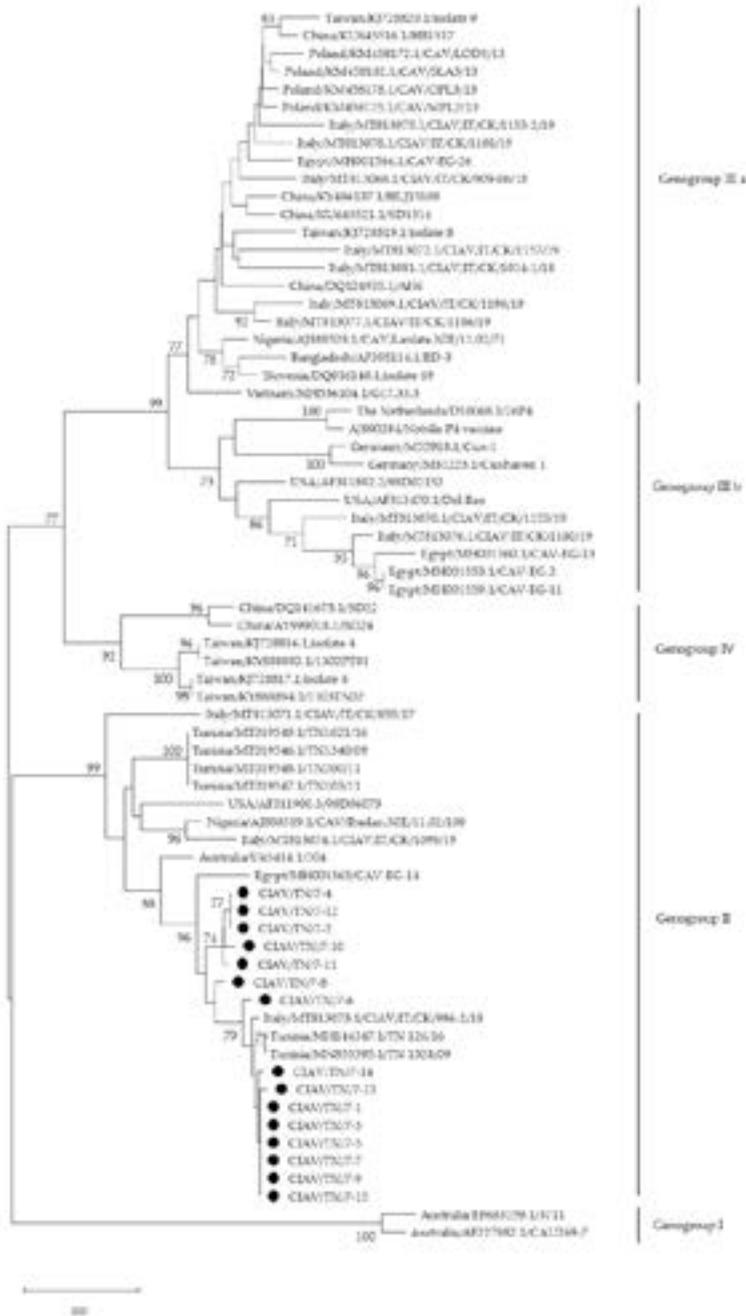


Figura 2. Albero filogenetico ottenuto dalle sequenze nucleotidiche complete del gene VP1 di ceppi CIAV identificati in Tunisia ed analizzati nel presente studio (marcati con cerchio nero) e di ceppi di riferimento presenti sul database *GenBank*.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente lavoro vengono caratterizzati ceppi CIAV provenienti da diverse aree geografiche del bacino del Mediterraneo. L'analisi filogenetica ha evidenziato una certa eterogeneità genetica nei ceppi circolanti in Italia e in Grecia, appartenenti ai genogruppi II, IIIa e IIIb; In Tunisia, dove il virus era stato già caratterizzato in passato, è stata confermata la circolazione di ceppi appartenenti al genogruppo II.

L'amplificazione del DNA virale di CIAV è stata ottenuta con successo oltre che da matrici convenzionali quali organi, anche da penne, tamponi cloacali 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Balamurugan, V. and Kataria, J. M., (2006). Economically important nonconogenic immunosuppressive viral diseases of chicken—current status. *Veterinary Research Communications*, 30(5), 541–566.
2. 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].
3. 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.
4. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). *Molecular Biology and Evolution*. 35:1547-1549.
5. 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. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00401>.
6. 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*.
7. 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.
8. 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.
9. Ou, S. C., Lin, H. L., Liu, P. C., Huang, H. J., Lee, M. S., Lien, Y. Y., & Tsai, Y. L. (2018). Epidemiology and molecular characterization of chicken anaemia virus from commercial and native chickens in Taiwan. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1493–1501.
10. Peters, M. A., Crabb, B. S., Washington, E. A., & Browning, G. F. (2006). Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of Chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *Journal of General Virology*, 87, 823–831.

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. Yuasa N., Imai K. (1986). Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* 15:639-645.
15. Nsiri, J.; Maher, K.; Larbi, I.; Gribâa, L.; El Béhi, I.; Ben Rhouma, W.; Ghram, A. (2009). L'anémie infectieuse aviaire en Tunisie : Résultats préliminaires. 1ère Journée Nationale Avicole, Tunisie,
16. Nsiri, J.; Elhadj, E.; Larbi, I.; Tombari, W.; El Behi, I.; Arbi, M.; Fathalah, I.; Ammouna, F.; Triki, S.; Ghram, A. (2013) Isolement et caractérisation moléculaire du virus de l'anémie infectieuse aviaire. 5ème Journée Nationale Avicole, Tunisie.